COUNTWAY LIBRARY
HC 66XU

BOSTON MEDICAL LIBRARY
IN THE
FRANCIS A. COUNTWAY
LIBRARY OF MEDICINE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/medical-microbiology-and-immunology_1961-1962_148

An die Mitarbeiter und Leser unserer Zeitschrift

Die Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten wird mit Beginn dieses Bandes fortgeführt als

Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Virologie.

Durch diese Ergänzung des ehrwürdigen, aus der Zeit Robert Kochs stammenden Titels wird eine Entwicklung bestätigt, die immer stärker in Erscheinung tritt. Verlag und Herausgeber der Zeitschrift können sich der Tatsache nicht verschließen, daß die früher bestehende enge Verbindung von Hygiene und Mikrobiologie bei der Ausweitung beider Disziplinen und der fortschreitenden Spezialisierung im ursprünglichen Sinne nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Die Tendenz der Mikrobiologie und Serologie zu allgemein biologischen Fragen ist hierbei ebenso maßgebend wie die Interessenverlagerung der Hygiene von der Seuchenbekämpfung zu Problemen, die mit chemischen und physikalischen Umweltnoxen eines technischen Zeitalters in Zusammenhang stehen.

In unserer Zeitschrift hat sich diese Trennung praktisch schon seit geraumer Zeit vollzogen. Arbeiten über mikrobiologisch-immunologische Probleme rückten immer mehr in den Vordergrund, während Publikationen, deren Themenstellung mit hygienischen Fragen zusammenhing, immer seltener veröffentlicht wurden. Umgekehrt haben sich andere deutschsprachige Zeitschriften, die bisher ebenfalls das gesamte Gebiet der Hygiene und Mikrobiologie vertraten, mehr auf Arbeiten der Umwelthygiene eingestellt.

Durch eine klare Abgrenzung erhoffen wir uns neue Impulse für die Zeitschrift. Wir sind überzeugt, daß unser Entschluß die Billigung aller derjenigen Autoren findet, deren Arbeitsgebiet bereits durch die skizzierte wissenschaftliche Entwicklung gekennzeichnet ist.

Redaktion und Verlag

Zeitschrift f. Hygiene 148, 2—13 (1961)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. R. Haas)

Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren*

I. Mitteilung:

Untersuchungen über die Adsorption und Elution von Polioviren unter Verwendung von Aluminiumhydroxyd als Adsorbens

Von

R. Haas, R. Thomssen, G. Maass und A. Gieseler

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Juli 1961)

Rhoads[7] adsorbierte 1931 Poliovirus aus einer Hirnsuspension infizierter Rhesusaffen an Aluminuimhydroxyd vom Typ Cγ nach Willstätter u. Kraut[11] in saurem Milieu, und es gelang ihm, das Virus in alkalischem Milieu wieder zu eluieren. Die beiden p_H-Werte, mit denen der Autor arbeitete, wurden mit Hilfe einer Dinatriumphosphatlösung einerseits und einer Monokaliumphosphatlösung andererseits eingestellt. Diese Befunde wurden von Schaeffer u. Brebner[10] und von Sabin[8,9] auf ihre Eignung zur Reinigung von Poliovirus überprüft.

In neuerer Zeit hat vor allem Matheka[5] Aluminiumhydroxyd für die Reinigung von MKS-Virus verwendet. Die Elution der MKS-Viren war in alkalischem Milieu bei relativ hoher Molarität des Phosphatpuffers möglich.

Da in den bisher vorliegenden Untersuchungen die Bedingungen, von denen Adsorption und Elution des Poliovirus abhängen, noch nicht näher geprüft worden waren, haben wir dieselben unter Verwendung von Aluminiumhydroxyd Cγ nach Willstätter u. Kraut näher untersucht. Über einen Teil unserer Ergebnisse wird nachfolgend berichtet.

Material und Methoden

Virusmaterial. Für unsere Versuche verwendeten wir Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney. Das Virus war in Affennierenzellkulturen nach konventioneller Technik vermehrt worden[12]. Als Vermehrungsmedium diente 0,5%iges Lactalbuminhydrolysat (LAH) in Hankslösung. Das Virusmaterial wurde nach der Ernte scharf zentrifugiert und über eine Klär- und Sterilfilterschichtenkombination (US-Filter Fa. Seitz; M 4-Filter, Fa. Membranfiltergesellschaft Göttingen) weiter gereinigt. Seine Stickstoffkonzentration betrug etwa 60 mg-%.

* Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Mitteln für die Durchführung dieser Arbeit.

Adsorbens. Als Adsorbens wurde Aluminiumhydroxyd Cγ nach Willstätter u. Kraut[11] benutzt. Es wurde uns dankenswerterweise von der chemischen Abteilung der Behringwerke, Marburg, zur Verfügung gestellt*. Es handelte sich um Suspensionen, welche in 100 ml eine 1 g bzw. 2 g Al_2O_3 entsprechende Menge an Tonerdegel in gealtertem Zustand enthielten.

Viruskonzentrationsbestimmungen. Die Viruskonzentrationsbestimmungen wurden entweder auf Röhrchenkulturen von Affennierengewebe (log_{10}-Stufen, Besetzung 4—6 Röhrchen pro Stufe) oder im Plaquetest[2] auf FL-Zellen[1] (log_{10}-Stufen, zwei Flaschen pro Stufe, Beimpfungsvolumen 0,2 ml, Adsorptionszeit 60 min) durchgeführt. Die Berechnung der Viruskonzentration erfolgte entweder nach Reed u. Muench[6] in ID_{50}/ml oder aber als pfu/Beimpfungsvolumen.

Stickstoffbestimmungen. Stickstoffbestimmungen wurden nach Kjeldahl in der von Kabat u. Mayer beschriebenen Modifikation durchgeführt[3]. Die p_H-Messungen erfolgten mit dem Electrometer der Fa. Knick, App. Typ 12.

Adsorption und Elution. Die Adsorptionen und Elutionen wurden im allgemeinen, wenn nicht anders vermerkt, wie folgt durchgeführt: 0,5 ml Tonerdegelsuspension verschiedener Konzentration wurden mit 4,5 ml Virussuspension in einem Zentrifugenröhrchen vermischt und 15 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Das Gel wurde dann kurz (5 min) bei etwa 3000 U/min abgeschleudert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde anschließend in 5,0 ml aqua bidest. unter Schütteln gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Dekantieren des flüssigen Überstandes wurde sodann unter verschiedenen Bedingungen eluiert.

Ergebnisse

1. In einer Anzahl von Vorversuchen orientierten wir uns darüber, unter welchen Voraussetzungen überhaupt eine einigermaßen quantitative Adsorption und Elution möglich ist. Der folgende Versuch stellt eines dieser Experimente, die sich als gut reproduzierbar erwiesen, dar.

Virus. Mahoney unverdünnt (Konzentration in Tab. 1); *Adsorbens.* Aluminiumhydroxyd Cγ 2%ig; *Adsorption.* 90 ml Viruslösung + 10 ml Adsorbens, p_H 7,3, Adsorptionsdauer (AD): 120 min; *Waschen.* 100 ml aqua bidest.; *Elution.* 100 ml m/3 Phosphatpuffer nach Sörensen, p_H 7,3, Elutionsdauer (ED): 20 min; *Viruskonzentrationsbestimmung.* Röhrchentest auf Affennierengewebekulturen. Konzentrationsangaben in $log_{10}ID_{50}$/ml.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Tab. 1 wiedergegeben. Wie man daraus sieht, wurde das Virus zu mehr als 90% adsorbiert. Überstand und Waschwasser enthielten nur geringe Virusmengen, während im Eluat das Virus fast vollständig wieder vorlag. Gegenüber dem von Sabin mitgeteilten Befund ist an dem Ausfall unserer Versuche überraschend, daß in unseren Händen die Adsorption des Virus im neutralen bis schwach alkalischen Milieu ohne weiteres möglich war, während in den Untersuchungen von Sabin eine saure Reaktion des Milieus Vorbedingung war. Um diesen Punkt weiter zu klären, haben wir die folgenden Untersuchungen durchgeführt (a, b und c).

a) Der Ausfall unserer ersten Experimente ließ vermuten, daß die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen adsorbiertem Virus und Virus

* Wir danken Herrn Prof. Dr. Schultze für die Überlassung des Präparates.

in der flüssigen Phase nicht so sehr oder wenigstens nicht allein eine Funktion des p_H-Wertes, sondern der Phosphationenkonzentration ist. Wir haben deshalb die Gleichgewichte bei konstantem p_H in Gegenwart verschiedener Phosphationenkonzentrationen eingestellt. Hierbei verfuhren wir so, daß wir das Virus zunächst aus der Lösung, in der es vorlag, adsorbierten und das Adsorbat mit aqua bidest. wuschen. Die Variation der Phosphationenkonzentration erfolgte über die Elutionsflüssigkeiten.

Tabelle 1

Die Adsorption von Polivirus Typ 1, Stamm Mahoney, an Aluminiumhydroxydgel Cγ

	Ausgangsmaterial	Überstand	Waschwasser	Eluat
Viruskonzentration (log ID_{50}/ml)	7,3	4,4	4,5	7,3
Stickstoffkonzentration (mg-%)	32,2	30,6	4,6	0,64

Tabelle 2. *Die Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, von Aluminiumhydroxydgel Cγ bei unterschiedlichen Phosphationenkonzentrationen im Elutionsmilieu*

	Viruskonzentration (log ID_{50}/ml) im					
Ausgangsmaterial	Ü	W	Eluat m/15	Eluat m/100	Eluat m/500	Eluat m/25600
7,3	4,4	4,4	7,0	7,3	6,5	3,6

Virus. Mahoney unverdünnt (Konzentration in Tab. 2); *Adsorbens.* Aluminiumhydroxyd Cγ 2%ig; *Adsorption.* 90 ml Virus + 10 ml Adsorbens; p_H 7,3, AD: 120 min; *Waschen.* 100 ml aqua bidest.; *Elution.* Je 100 ml Phosphatpuffer nach Sörensen mit einer Phopshationenkonzentration von m/15, m/100, m/400 und m/25600. Die Einstellung des genauen p_H-Wertes von 7,3 wurde mit n/10 NaOH vorgenommen; ED: 20 min; *Viruskonzentrationsbestimmung.* Röhrchentest auf Affennierengewebekulturen. Konzentrationsangaben in $\log_{10} ID_{50}$/ml.

Tab. 2 gibt das Ergebnis dieses Versuches wieder. Wie zu ersehen, gelang eine quantitative Elution nur mit Lösungen, deren Phosphatkonzentration oberhalb 0,01 m lag. Bei niedrigerer Konzentration blieb das Virus größtenteils am Adsorbens haften.

b) Ausgehend von dem Ergebnis des vorstehenden Versuches haben wir die Elution, nachdem die Adsorption und das Waschen unter gleichförmigen Bedingungen vorgenommen worden waren, mit verschiedenen Elutionsflüssigkeiten versucht. Wir benutzten Hankslösung, 0,5%ige LAH-Lösung (Lactalbuminhydrolysat), sodann eine Phosphatlösung jener Konzentration, in welcher die Phosphationen in der Hankslösung vorliegen. Weiter verwendeten wir eine Phosphatlösung der in der Hankslösung vorliegenden Konzentration, jedoch zusätzlich noch Calciumchlorid und Magnesiumchlorid in der Konzentration enthaltend,

in welcher beide Salze in Hankslösung vorhanden sind. Schließlich wurde auch mit 0,2 m Phosphatlösung eluiert.

Virus. Mahoney 1:10 verdünnt in aqua bidest. (Konzentration in Tab.3); *Adsorbens.* Aluminiumhydroxydgel Cγ 1%ig; *Adsorption.* 4,5 ml Virus + 0,5 ml Adsorbens; p_H 7,0; AD: 15 min; *Waschen.* 5 ml aqua bidest., p_H 7,0; *Elution.* 5,0 ml folgender Lösungen: Hankslösung, 0,5% LAH in Hankslösung, Phosphatlösung der Konzentration der Hankslösung entsprechend, ferner letztere Lösung mit einem Zusatz von $CaCL_2$ und $MgCl_2$, ebenfalls jener der Hankslösung entsprechend. Als Kontrolle diente 0,2 m Phosphatlösung. ED: 15 min; p_H 7,4—7,6 eingestellt mit n/10 NaOH; *Viruskonzentrationsbestimmung.* Röhrchentest auf Affennierengewebekulturen. Konzentrationsangaben in $\log_{10} ID_{50}$/ml.

Tabelle 3

Die Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, von Aluminiumhydroxydgel Cγ unter den Bedingungen der Gewebekulturflüssigkeit

Viruskonzentration (log ID_{50}/ml) im	
Ausgangsmaterial	6,5
Überstand	4,0
Waschwasser	4,25
Eluat (Hankslösung)	4,0
Eluat (LAH-Lösung)	3,75
Eluat (PO_4-Hankslösung)	5,0
Eluat (PO_4-Hankslösung) + $CaCl_2$ + $MgCl_2$)	4,25
Eluat (0,2 m Phosphat)	6,5

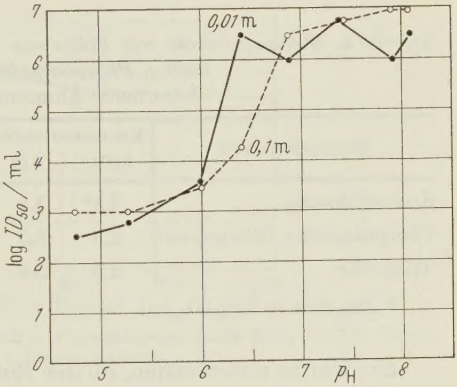


Abb. 1. Die Abhängigkeit der Elution des Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, vom p_H-Wert des Phosphatpuffers. Adsorbens: Aluminiumhydroxyd Cγ

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Tab.3 dargestellt. Es weist darauf hin, daß die Phosphationenkonzentration der Hankslösung offensichtlich zu niedrig ist, um das Virus in dem sich bei der Adsorption bzw. Elution einstellenden Gleichgewicht überwiegend in der flüssigen Phase zu halten. Die Phosphationenkonzentration der Hankslösung beträgt 0,00087 m, sie liegt damit unterhalb des sich aus Versuch 1 a ergebenden kritischen Wertes von etwa 0,01 m. Damit wird der in Experiment 1 erhobene Befund verbindlich, daß das Poliovirus auch im neutralen und schwach alkalischen Milieu adsorbiert werden kann.

c) In den folgenden Versuchen haben wir — ausgehend von dem Befund Sabins, wonach Poliovirus in saurem Milieu auch in Anwesenheit stärkerer Konzentrationen von Phosphaten adsorbiert wird — die Abhängigkeit des sich bei der Adsorption bzw. Elution einstellenden Gleichgewichtes vom p_H-Wert untersucht, und zwar in Gegenwart von zwei verschiedenen Phosphatkonzentrationen.

Virus. Mahoney 1:10 in aqua bidest. verdünnt (Konzentration in Abb. 1); *Adsorbens.* Aluminiumhydroxyd Cγ 2%ig in aqua bidest.; *Adsorption.* 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virus, p_H 7,0; AD: 15 min; *Elution.* 5 ml 0,01 m oder 0,1 m Phosphatpuffer nach Sörensen verschiedener p_H-Werte; ED: 15 min; *Viruskonzentrationsbestimmung.* Röhrchentest auf Affennierengewebe. Konzentrationsangaben in $\log_{10}ID_{50}$/ml.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 1 dargestellt. Es besagt, daß für die Einstellung des Gleichgewichtes neben der Phosphationenkonzentration auch die Wasserstoffionenkonzentration von großer Bedeutung ist. Das Virus bleibt trotz relativ hoher Phosphatkonzentrationen weitgehend adsorbiert, wenn der p_H-Wert unter 6,5 liegt. Damit sind die älteren Befunde, speziell die von Sabin, bestätigt.

Tabelle 4. *Elutionsversuche von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, mit Kochsalzlösung, Phosphatpuffer und Trispuffer*
Adsorbens: Aluminiumhydroxyd Cγ

Elutionsflüssigkeit	Konzentration der Elutionsflüssigkeit in mol/l					Konzentration des Ausgangsmaterials
	0,001	0,01	0,1	0,2	1,0	
Kochsalzlösung	3,8*	3,8	3,8	4,3	4,8	6,3
Phosphatpuffer (Sörensen)	2,5	6,3	6,3	6,0	—	6,3
Trispuffer	1,5	3,8	4,8	4,3	—	6,3

* Angaben in $\log_{10}ID_{50}$/ml.

2a. Um zu untersuchen, ob der Rolle der Phosphationen eine gewisse Spezifität bei der Elution zukommt, haben wir Poliovirus in weiteren Versuchen mit Lösungen von Phosphaten, Trispuffer und Kochsalz verschiedener Konzentration im schwach alkalischen Bereich zu eluieren versucht.

Virus. Mahoney 1:10 in aqua bidest. verdünnt (Konzentration in Tab. 4); *Adsorbens.* Aluminiumhydroxyd Cγ 2%ig; *Adsorption.* 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virussuspension; AD: 15 min, p_H 7,0; *Elution.* 5,0 ml Phosphatpuffer nach Sörensen verschiedener Konzentration; 5 ml Kochsalzlösung und Trispuffer verschiedener Konzentration, mit NaOH im Elutionsmilieu auf ein p_H von 7,3—7,7 eingestellt; ED: 15 min; *Viruskonzentrationsbestimmung.* Röhrchentest auf Affennierengewebe. Konzentrationsangaben in $\log_{10}ID_{50}$/ml.

Tab. 4 enthält die Angaben über den Ausfall dieser Versuche. Danach kommt den Phosphationen in der Tat eine gewisse Spezifität bei der Elution des Poliovirus zu. Kochsalzlösung und Trispuffer hatten selbst in relativ hoher Konzentration nur eine sehr geringe eluierende Wirkung.

2b. Wenn auch die bisher durchgeführten Versuche die besondere Rolle der Phosphationen bei der Elution des Poliovirus deutlich belegten, so brachten sie doch noch keinerlei Hinweise zum Verständnis dieses Effektes. Derartige Hinweise gehen aus folgenden Versuchen hervor, in denen wir die Wirkung von Mg-Ionen und von ÄDTA auf die Elution

von Poliovirus untersuchten. Zunächst wurde der Einfluß von Magnesiumionen auf die Elution untersucht.

Virus. Mahoney 1:10 verdünnt mit aqua bidest. (Konzentration in Abb. 2); *Adsorbens.* Aluminiumhydroxyd Cγ 2%ig; *Adsorption.* 4,5 ml Virus + 0,5 ml Adsorbens, p_H 7,0; AD: 15 min; *Elution.* 5 ml 0,02 m Phosphatpuffer, p_H 7,4, dem verschiedene Mengen Magnesiumchlorid zugesetzt waren ($MgCl_2$ 0,01 m, 0,02 m, 0,04 m und 0,08 m); ED: 15 min; *Viruskonzentrationsbestimmung.* Plaquetest auf FL-Gewebe; Konzentrationsangaben in $\log_{10}$pfu/0,2 ml.

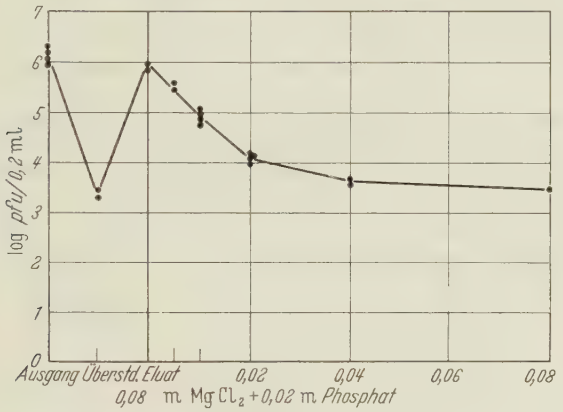


Abb. 2. Hemmung der Elutionswirkung von 0,02 m Phosphatlösung durch $MgCl_2$, p_H 7,4; Virus: Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney

Tabelle 5. *Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, von Aluminiumhydroxyd Cγ durch ÄDTA*
Angaben in $\log_{10}ID_{50}$/ml

Virus-ausgangskonzentration	Konzentration im Überstand	Konzentration im Eluat bei ÄDTA-Konzentration von				
		0	0,05	0,1	0,15	0,2 m
7,0	4,0	4,8	6,3	7,3	7,0	7,0

Die Abb. 2, welche die Ergebnisse dieses Versuches wiedergibt, zeigt, daß durch Zusatz von Magnesiumchlorid die Elution des Poliovirus verhindert wird und daß diese Wirkung konzentrationsabhängig ist.

Wir haben dann weiter, wie schon gesagt, den Einfluß des Metallkomplexbildners ÄDTA auf die Elution von Polioviren von Aluminiumhydroxyd untersucht.

Virus. Mahoney 1:10 verdünnt mit aqua bidest. (Konzentration in Tab. 5); *Adsorbens.* Aluminiumhydroxyd Cγ 1%ig; *Adsorption.* 4,5 ml Virus + 0,5 ml Adsorbens; p_H 7,0; AD: 15 min; *Elution.* 5,0 ml Lösungen von ÄDTA verschiedener Konzentration; p_H 7,8, eingestellt mit n/10 NaOH; ED: 30 min; *Viruskonzentrationsbestimmung.* Röhrchentest auf Affennierengewebe. Konzentrationsangaben in $\log_{10}ID_{50}$/ml.

Wie aus den in Tab. 5 dargestellten Resultaten des Versuches hervorgeht, ist ÄDTA allerdings erst in relativ hoher Konzentration in der Lage, Polioviren auch in Abwesenheit von Phosphationen zu eluieren.

Die Ergebnisse der beiden vorstehend geschilderten Versuche weisen unseres Erachtens darauf hin, daß bei der Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, von Aluminiumhydroxyd Cγ bestimmte Metallionen das Gleichgewicht zugunsten der Adsorption verschieben. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, die Natur dieser Ionen und ihre Rolle aufzuklären.

3. Bereits von Beginn unserer Untersuchungen über Adsorption und Elution von Poliovirus Typ 1 an bzw. von Aluminiumhydroxyd haben

Tabelle 6. *Virusausbeute und Reinigungserfolg nach Adsorption von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, an Aluminiumhydroxyd Cγ und Elution durch 0,2 m Phosphatpuffer*

	Ausgangswert		An-	Überstand		Waschwasser		Eluat	
	pfu*	N**	satz	pfu	N	pfu	N	pfu	N
	$7{,}4 \cdot 10^6$	65,7	1	$9{,}1 \cdot 10^3$	56,8	$8{,}0 \cdot 10^3$	3,3	$7{,}2 \cdot 10^6$	1,8
	5,1			9,5		15,0		7,4	
	7,2		2	17,0	56,4	5,0	3,6	6,5	1,8
				16,0		7,0		4,9	
			3	8,2	56,9	10,0	3,3	6,0	3,4
				8,0		11,0		5,7	
			4	15,0	57,4	12,0	3,3	6,5	2,9
						11,0		4,3	
			5	24,0	57,5	10,0	3,3	8,9	2,9
				25,0		14,0		7,1	
Mittel-	$6{,}6 \cdot 10^6$	65,7		$9{,}8 \cdot 10^3$	57,0	$10{,}3 \cdot 10^3$	3,4	$6{,}45 \cdot 10^6$	2,4
werte	100%	100%		0,2%	87,4%	0,2%	5,8%	107,0%***	4,1%

* pfu/0,2 ml. — ** mg-%. — *** unter Berücksichtigung der Volumendifferenz zwischen Ausgangsmaterial und Eluat.

wir den Zweck mit verfolgt, auf diesem Wege einen bequem ausführbaren Schritt der Virusreinigung zu vollführen. Über die in dieser Beziehung gemachten Erfahrungen sollen die folgenden Versuche orientieren. Zunächst gilt es, Aufschluß über die Reproduzierbarkeit des Verfahrens zu erhalten. Hierzu haben wir Adsorption und Elution fünfmal im Parallelversuch vorgenommen.

Virus. Mahoney, unverdünnt (Konzentration in Tab. 6); *Adsorbens.* Aluminiumhydroxyd Cγ 2%ig; *Adsorption.* 4,5 ml Virus + 0,5 ml Adsorbens; p_H 7,0; AD: 15 min; *Waschen.* 5,0 ml aqua bidest., *Elution.* 5 ml Phosphatpuffer 0,2 m nach Sörensen, p_H 7,4; ED: 15 min; *Viruskonzentrationsbestimmung.* Plaquetest auf FL-Gewebe. Konzentrationsangaben in pfu/0,2 ml.

Tab. 6 gibt die Resultate dieses Versuches wieder. Bei der Berechnung der Ausbeuten wurden die Volumendifferenzen zwischen Ausgangsmaterial, Waschwasser und Eluaten berücksichtigt. Aus den Werten

der Tab. 6 geht hervor, daß es gelingt, das Poliovirus aus dem Adsorbat fast ohne Verlust an Infektiösität zu eluieren unter gleichzeitiger Senkung der Stickstoffkonzentration auf etwa 4% ihres Ausgangswertes. Drückt man den Reinigungseffekt durch den Quotienten pfu/100 mg N aus, so ergibt sich eine Steigerung von rund $1 \cdot 10^7$ auf $2{,}7 \cdot 10^8$ durch die einmalige Operation des Adsorbierens und Eluierens.

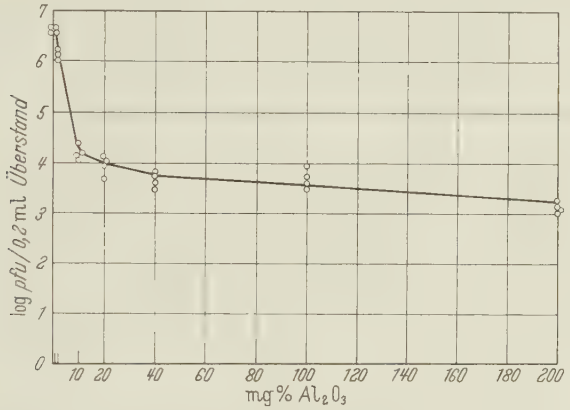


Abb. 3. Die Adsorption von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, an Aluminiumhydroxyd C γ unterschiedlicher Konzentration

Tabelle 7. *Der Einfluß unterschiedlicher Adsorptionszeiten auf die Adsorption von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, an Aluminiumhydroxyd*
Angaben in lg ID_{60}/ml

Virusausgangskonzentration	Viruskonzentration im Überstand nach Adsorptionzeit von			
	10 min	20 min	30 min	60 min
7,7	5,4	4,7	5,3	5,4

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß der Menge des Adsorbens auf den Adsorptionseffekt geprüft.

Virus. Mahoney unverdünnt (Konzentration in Abb. 3); *Adsorbens.* Aluminiumhydroxyd Cγ 2%ig, 1%ig, 0,4%ig, 0,2%ig, 0,1%ig, 0,02%ig; *Adsorption.* 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virussuspension, p_H 7,0; AD: 15 min; *Viruskonzentrationsbestimmung.* Plaquetest auf FL-Gewebe. Konzentrationsangaben in $\log_{10}$pfu/0,2 ml.

Abb. 3 veranschaulicht das Ergebnis des Versuches. Danach genügte unter den geschilderten Bedingungen schon eine 5 mg-% Al_2O_3 entsprechende Menge an Aluminiumhydroxyd Cγ, um ca. 90% des Virus zu adsorbieren. Eine 1,0 mg Al_2O_3 entsprechende Menge des verwendeten Tonerdegelpräparates konnte über $10^{8,4}$ pfu binden.

Um zu prüfen, ob die Adsorptionszeit von 15 min ausreicht, um den größten Teil des Virus zu adsorbieren, variierten wir in weiteren Versuchen die Adsorptionszeit.

Virus. Mahoney 1:10 in aqua bidest. verdünnt (Konzentration in Tab.7); *Adsorbens.* Aluminiumhydroxyd Cγ 2%ig; *Adsorption.* 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virus, p_H 7,0; AD: 10 min, 20 min, 30 min, 60 min; *Viruskonzentrationsbestimmung.* Plaquetest auf FL-Gewebe. Konzentrationsangaben in pfu/0,2 ml.

Das in Tab.7 dargestellte Ergebnis zeigt, daß bereits nach 10 min praktisch das Adsorptionsgleichgewicht erreicht ist. Kürzere Zeiten als 10 min wurden nicht geprüft.

Schließlich haben wir noch versucht, festzustellen, welche Zeit für die Einstellung des Elutionsgleichgewichtes benötigt wird. Hierzu haben wir nicht nur die Elutionszeiten, sondern auch die Menge des Adsorbens variiert, um den Einfluß des letzteren gleichzeitig mit zu erfassen.

Tabelle 8. *Der Einfluß unterschiedlicher Elutionszeiten auf die Elution von Poliovirus unter Berücksichtigung verschiedener Konzentrationen des Adsorbens*

Konzentration des Adsorbens in mg-%	Viruskonzentration in pfu/0,2 ml im					
	Ausgangs-material	Überstand	Eluat 10 min	Eluat 20 min	Eluat 30 min	Eluat 60 min
200	$13 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^3$	$3{,}3 \cdot 10^5$	$3{,}7 \cdot 10^5$	$4{,}0 \cdot 10^5$	$3{,}6 \cdot 10^5$
	$13 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^3$				
100		$2 \cdot 10^3$	$6{,}4 \cdot 10^5$	$7{,}2 \cdot 10^5$	$6{,}8 \cdot 10^5$	$9{,}4 \cdot 10^5$
		$3 \cdot 10^3$	$6{,}9 \cdot 10^5$	$6{,}0 \cdot 10^5$	$7{,}2 \cdot 10^5$	$9{,}7 \cdot 10^5$
50		$6 \cdot 10^3$	$8{,}2 \cdot 10^5$	$7{,}5 \cdot 10^5$	$8{,}2 \cdot 10^5$	$9{,}6 \cdot 10^5$
		$4 \cdot 10^3$	$9{,}8 \cdot 10^5$	$7{,}9 \cdot 10^5$	$8{,}3 \cdot 10^5$	$7{,}6 \cdot 10^5$

Virus. Mahoney 1:10 verdünnt in aqua bidest. (Konzentration in Tab.8); *Adsorbens.* Aluminiumhydroxyd Cγ 2%ig, 1%ig und 0,5%ig; *Adsorption.* 4,0 ml Virus + 1,0 ml Adsorbens; AD: 15 min: *Elution.* 5,0 ml 0,1 m Phosphatpuffer nach Sörensen, p_H 7,5; ED: 10 min, 20 min, 30 min, 60 min: *Viruskonzentrationsbestimmung.* Plaquetest auf FL-Gewebe. Angaben in log pfu/0,2 ml.

Das Ergebnis ist in Tab.8 dargestellt. Danach läßt sich die Feststellung treffen, daß bei allen von uns geprüften Konzentrationen des Adsorbens eine Elutionszeit von 15 min ausreichte, um die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen adsorbiertem und in der flüssigen Phase befindlichen Virus zu erreichen. Es kann weiter der Schluß gezogen werden, daß die Ausbeute im Eluat bei höherer Konzentration des Adsorbens anscheinend etwas schlechter wird. Es ergibt sich aus anderen Befunden, die in einer folgenden Arbeit mitgeteilt werden, daß man in solchen Fällen nicht so sehr die Elutionszeit verlängern, sondern vor allem die Phosphationenkonzentrationen steigern muß, um eine bessere Ausbeute zu erzielen. Es empfiehlt sich für die Durchführung von Virusreinigungen, mit Hilfe des angegebenen Verfahrens also, die Adsorbensmenge nicht zu hoch zu wählen, wenn die Virusausgangskonzentrationen niedrig liegen. Einen gewissen Anhalt für die zweckmäßige Dosis Adsorbens erhält man aus Abb.3.

Besprechung der Ergebnisse

Unsere Untersuchungen befaßten sich mit den quantitativen und qualitativen Verhältnissen der Adsorption und Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, an bzw. von Aluminiumhydroxyd $C\gamma$ nach Willstätter u. Kraut[11]. Ältere Untersucher, in erster Linie Sabin[8,9], Rhoads[7] und Schaeffer[10] hatten gezeigt, daß Poliovirus in Abhängigkeit vom p_H-Wert an Aluminiumhydroxyd adsorbiert und unter geeigneten Bedingungen wieder eluiert werden kann. Diese älteren Untersuchungen konnten aus technischen Gründen nur qualitativ durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu den älteren Befunden konnten wir feststellen, daß die Adsorption von Poliovirus auch im neutralen bis schwach alkalischen Milieu gelingt, wenn die Phosphationenkonzentration im Adsorptionsmilieu einen bestimmten Wert nicht überschreitet. Umgekehrt gelang die Elution des Poliovirus bei Anwesenheit höherer Phosphationenkonzentrationen nur im neutralen bis schwach alkalischen Bereich, während unterhalb eines p_H-Wertes von 6,4—6,8 das Gleichgewicht zwischen adsorbiertem und eluiertem Virus sich zugunsten des ersteren einstellte.

Wir konnten weiter zeigen, daß im Unterschied zu Phosphatpufferlösungen Trispuffer oder Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration bei neutraler bis schwach alkalischer Reaktion keine nennenswerte Elution des Virus bewirken. LoGrippo[4] hat eine ähnliche spezifische Wirkung von Phosphationen bei der Elution von an Amberlite (EX-67)-adsorbiertem Poliovirus (mäuseadaptierter Lansingstamm) festgestellt. Wir haben versucht, diese Wirkung der Phosphationen etwas aufzuklären. Arsenationen haben einen ähnlichen Effekt, wie noch unveröffentlichte Untersuchungen zeigten. Beide Ionenarten bilden mit bestimmten zweiwertigen Kationen relativ schwer lösliche Salze. Fügt man Lösungen, die Phosphate enthalten, abgestufte Mengen von Magnesiumchlorid zu, so wird die Elution gehemmt. Umgekehrt war eine Elution des Virus auch ohne die erwähnten Anionen möglich, wenn wir dem Elutionsmilieu den Metallkomplexbildner ÄDTA zusetzten. Kationen sind also offenbar an der Adsorption des Poliovirus an das Aluminiumhydroxyd in neutralem oder schwach alkalischem Milieu irgendwie beteiligt und verschieben in diesem Bereich das Gleichgewicht zugunsten des adsorbierten Virus. Vielleicht spielt dabei der Umstand eine Rolle, daß in schwach alkalischem Milieu das Aluminiumhydroxyd negativ geladen, das Poliovirus aber ebenfalls Träger vorwiegend negativer Ladungen ist. Daß neben der Wasserstoffionenkonzentration und dem Ionenmilieu die Feinstruktur der Virusoberfläche ein weiterer Faktor ist, der das Gleichgewicht zwischen adsorbiertem und frei suspendiertem Virus beeinflußt, wird aus Versuchen deutlich, die in einer folgenden Arbeit mitgeteilt werden.

Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß es mit der angegebenen Methodik gelingt, Poliovirus vom Stamm Mahoney und einem Titer von 7,5 $\log_{10}ID_{60}$/ml in einer Ausbeute von über 90% aus dem Adsorbat wiederzugewinnen. Die Ergebnisse streuen in verschiedenen Versuchsansätzen bei Einhaltung bestimmter Bedingungen nur gering. Das Viruseluat enthält nur etwa 4—5% des Stickstoffs des Ausgangsmaterials. Die auf die geschilderte Weise leicht zu entfernenden stickstoffhaltigen Substanzen sind vorwiegend niedermolekular. Bei der Verwendung der Methodik zur Reinigung von Virussuspensionen müssen verschiedene Parameter beachtet werden, welche die Ausbeute stark beeinflussen können. Es sind dies das Verhältnis von Konzentration des Virus zur Konzentration des Adsorbens, die Adsorptions- bzw. Elutionszeiten, die Konzentrationen von bestimmten Anionen und Kationen im jeweiligen Reaktionsgemisch und schließlich der Virusstamm selbst. Im allgemeinen sind die Gleichgewichte sehr schnell eingestellt, so daß man in der Wahl der Zeiten relativ großen Spielraum hat. Nach 10 min sind in den meisten Fällen keine wesentlichen Änderungen mehr zu erwarten. Vielleicht reichen noch kürzere Zeiten aus. Unsere Versuche geben hierüber keinen Aufschluß. Um bei hohen Konzentrationen des Adsorbens maximale Virusausbeuten im Eluat zu erzielen, ist es nötig, höhere Phosphationenkonzentrationen zu verwenden. Verlängerung der Elutionszeit verbessert erwartungsgemäß die Ausbeute nicht. Es gelingt schon mit sehr kleinen Mengen Aluminiumhydroxyd, die in den Gewebekulturüberständen üblicherweise enthaltenen Viruskonzentrationen um über 99% zu senken, so daß man zweckmäßigerweise vor allem bei geringen Viruskonzentrationen im Ausgangsmaterial die Menge des Adsorbens nicht zu hoch wählen sollte. Ein gewisser Anhalt für die zweckmäßige Konzentration ergibt sich aus der Abb. 3 dieser Arbeit.

Zusammenfassung

Es werden Befunde über die Adsorption und Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, unter Verwendung von Aluminiumhydroxyd Cγ mitgeteilt. Unter geeigneten Bedingungen gelingt es, das Virus aus Gewebekulturflüssigkeiten zu über 99% zu adsorbieren, während ca. 95% des stickstoffhaltigen Materials nicht adsorbiert werden und mit dem Überstand dekantiert werden können. Die Elution des Virus gelingt praktisch quantitativ, wenn bestimmte Anionen wie Phosphate in genügender Konzentration vorhanden sind und die Konzentration des Adsorbens relativ zur Viruskonzentration nicht zu hoch gewählt wird. Magnesiumionen können die quantitativen Verhältnisse erheblich verschieben; sie hemmen die Elution des Poliovirus durch Phosphatlösung. Umgekehrt konnte mit dem Metallkomplexbildner ÄDTA auch ohne Phosphationen das Virus eluiert werden.

Literatur

[1] Fógh, J.: Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membranes. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **94**, 532 (1957).

[2] Hsiung, G. P., and J. L. Melnick: Letter to the editor: Plaque formation with poliomyelitis, coxsackie and orphan (ECHO) viruses in bottle cultures of monkey epithelial cells. Virology **1**, 533 (1955).

[3] Kabat, E. A., and M. Mayer: Experimental immunochemistry. Springfield, Ill.: Thomas 1948.

[4] LoGrippo, G. A.: Partial purification of viruses with anion exchange resin. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **74**, 208 (1950).

[5] Matheka, H. D.: Über das Verhalten des Maul- und Klauenseuchevirus bei Adsorption an Aluminiumhydroxyd und nachfolgende Elution. I. Untersuchungen der Faktoren, die die Adsorption und Elution beeinflussen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **174**, 473 (1959). II. Der Einfluß von Fremdeiweiß auf den Adsorptions- und Elutionsvorgang. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **174**, 493 (1959). III. Reinigung und Konzentrierung von Maul- und Klauenseuchevirus durch Aluminiumhydroxyd. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **175**, 40 (1959).

[6] Reed, L. J., and H. A. Muench: A simple method of estimating fifty per cent end point. Amer. J. Hyg. **27**, 43 (1938).

[7] Rhoads, C. P.: Immunization with mixtures of poliomyelitis virus and aluminium-hydroxide. J. exp. Med. **53**, 399—404 (1931).

[8] Sabin, A. B.: Purification of poliomyelitis viruses by adsorption and elution. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **29**, 59 (1931/32).

[9] Sabin, A. B.: Experiments on the purification and concentration of the virus of poliomyelitis. J. exp. Med. **56**, 307 (1932).

[10] Schaeffer, M., and W. B. Brebner: Purification of poliomyelitis virus. Arch. Path. (Chicago) **15**, 221 (1933).

[11] Willstätter, R., u. H. Kraut: I. Zur Kenntnis der Tonerdehydrate. Ber. dtsch. chem. Ges. **56**, 149 (1923). II. Über ein Tonerdegel von der Formel $Al(OH)_3$. Ber. dtsch. chem. Ges. **57**, 58 (1924).

[12] Youngner, J. S.: Monolayer tissue culture. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin dispersed monkey kidney cells. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **85**, 202 (1954).

Professor Dr. R. Haas,
Hygiene-Institut der Universität, Freiburg, Hermann Herder-Straße 15

Zeitschrift f. Hygiene 148, 14—27 (1961)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. R. Haas)

Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren*

II. Mitteilung:

Unterschiedliches Verhalten verschiedener Poliovirusstämme (Wildstämme und abgeschwächte Stämme) bei der Elution von Aluminiumhydroxyd

Von
R. Thomssen, G. Maass und R. Haas

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Juli 1961)

Im Zusammenhang mit der Lebendimpfung gegen Poliomyelitis hat die Frage Aktualität bekommen, Virusstämme des gleichen serologischen Typs voneinander unterscheiden zu können. Insbesondere konzentriert sich das Interesse darauf, Wildviren von attenuierten Viren und deren Nachkommen zu differenzieren. Hierfür wurde, abgesehen von der Bestimmung verschiedener in vitro feststellbarer Eigenschaften wie der Merkmale d[9], T[5] oder MS[11], vor allem die Untersuchung der Neutralisationskinetik durch Antikörper herangezogen[6]. Daneben verdient eine von Hoyer u. Mitarb.[3] benutzte Methode Interesse, bei welcher der Differenzierung das unterschiedliche Adsorptions- und Elutionsverhalten gegenüber DEAE-Cellulose zugrundeliegt. Hodes u. Mitarb.[2] konnten zeigen, daß sich die beiden Typ I-Stämme Mahoney und LSc, 2ab hinsichtlich ihrer Eluierbarkeit von DEAE-Cellulose sehr verschieden verhalten. Unter bestimmten Bedingungen war der Stamm Mahoney praktisch quantitativ eluierbar, der Stamm LSc,2ab jedoch nur zu höchstens 1—3%. Robbins u. Mitarb.[8] beschrieben 1960 ein im Prinzip analoges Verhalten der Virusstämme Mahoney und LSc_1ab in bezug auf die Elution von Aluminiumhydroxyd. Sie fanden, daß der Stamm Mahoney bei p_H 6,5 quantitativ eluierbar war, der Stamm LSc_1ab dagegen nicht einmal bei p_H 8,0. In einer früheren Mitteilung[1] haben wir beschrieben, daß die Adsorption von Poliovirus an Aluminiumhydroxyd und die Elution aus dem Adsorbat eine Funktion verschiedener

* Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Mitteln zur Durchführung dieser Arbeit.

Milieufaktoren ist, unter denen vor allem Phosphationen eine besondere Rolle spielen. Von diesen Beobachtungen ausgehend stellten wir uns die Frage, ob der bei der Adsorption und Elution der beiden Poliovirusstämme Mahoney und LSc, 2ab differenzierende Faktor tatsächlich, wie Robbins u. Mitarb.[8] annehmen, allein die Wasserstoffionen-Konzentration ist oder ob nicht daneben oder sogar überwiegend andere Faktoren, wie beispielsweise die Phosphationen-Konzentration, hierfür wichtig sind. Über die bei der experimentellen Bearbeitung dieser Frage erzielten Ergebnisse wird nachfolgend berichtet.

Material und Methoden

Die allgemeine Versuchsanordnung wurde in einer früheren Mitteilung[1] beschrieben.

Virusstämme. Typ I: Mahoney, Brunhilde, LSc, 2ab (Sabin), Wistar-Chat (Koprowski), Lederle-SM. Typ II: MEF_1, P 712 Ch 2ab (Sabin), Lederle-MEF_1 Typ III: Saukett, Leon 12a, b (Sabin), Lederle-Fox, WFX (Koprowski).

Die Stämme LSc, 2ab, P 712 Ch 2ab und Leon $12a_1b$ erhielten wir von Dr. Sabin, die Stämme Mahoney, MEF_1 und Saukett sowie Brunhilde von Dr. Salk. Bei diesen Stämmen handelte es sich um mehrfach passierte Laboratoriumsstämme. Die Stämme Wistar-Chat und WFX wurden uns vom Eidgenössischen Gesundheitsamt Bern (Dr. Schär) überlassen, die Lederle-Stämme isolierten wir aus einer Originalampulle „Orimmun" (7—1238—814b) durch entsprechenden Zusatz von Antiseren. Alle Stämme wurden in Affennierengewebekulturen vermehrt; als Vermehrungsmedium diente 0,5%iges Lactalbuminhydrolysat in Hanks-Lösung.

Adsorbens. Als Adsorbens wurde Aluminiumhydroxyd verwendet, das wir von der chemischen Abteilung der Behringwerke AG (Marburg) erhielten. Es handelt sich um ein Tonerdegel C γ, dessen Herstellung im wesentlichen nach den von Willstätter u. Kraut[10] angegebenen Vorschriften erfolgte. Es enthielt in 100 cm^3 aq. bidest. eine 1 bzw. 2 g Al_2O_3 entsprechende Menge Aluminiumhydroxyd. Die Präparate waren ausreichend gealtert, so daß im Verlauf der Versuche kaum mit einer Änderung ihrer adsorptiven Eigenschaften gerechnet werden mußte.

Adsorption und Elution. Adsorption und Elution wurden nach zwei unterschiedlichen Methoden vorgenommen. Bei dem einen Verfahren wurden in einer Reihe von Zentrifugenröhrchen Adsorbens und Virusmaterial in einem bestimmten, in jedem Röhrchen gleichen Volumenverhältnis gemischt. Nach kurzem Abschleudern in einer Zentrifuge, Dekantieren des flüssigen Überstandes und Waschen des Sedimentes mit aq. bidest. erfolgte die Elution, und zwar in sämtlichen Röhrchen eines Versuchsansatzes gleichzeitig. Wir bezeichnen deshalb im folgenden dieses Vorgehen als *simultanes* Verfahren. Der Unterschied zwischen den einzelnen Röhrchen bestand bei diesem Vorgehen darin, daß von Röhrchen zu Röhrchen Elutionsflüssigkeiten verschiedener Zusammensetzung bzw. verschiedener Konzentration verwendet wurden. Neben dieser Art der Versuchsanordnung bedienten wir uns des Verfahrens der *sukzessiven* Elution. Hierbei wurden lediglich in einem einzigen Röhrchen Adsorptionsmittel und Virusmaterial zusammengebracht. Nach Zentrifugieren und Dekantieren des flüssigen Überstandes erfolgte die Elution nacheinander mit verschieden zusammengesetzten bzw. verschieden konzentrierten Elutionsflüssigkeiten jeweils gleichen Volumens.

Ergebnisse

1. Die von Robbins u. Mitarb.[8] gefundene unterschiedliche Elution der Poliovirusstämme Mahoney und LSc_1 a b konnten wir für die Stämme Mahoney und LSc, 2 a b bestätigen. Bei Einhaltung der von

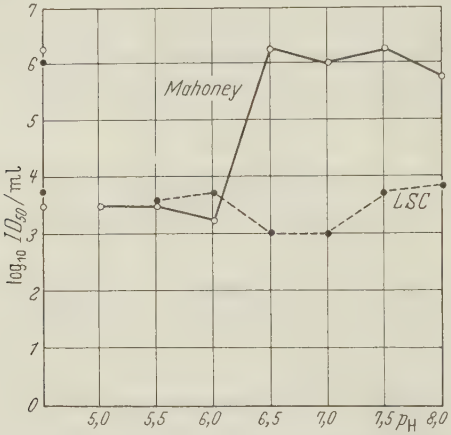


Abb. 1. Unterschiede in der Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm *Mahoney* und *LSc*, 2 a b, bei verschiedenen pH-Werten des Elutionsmilieus (0,1 m Sörensen-Puffer)

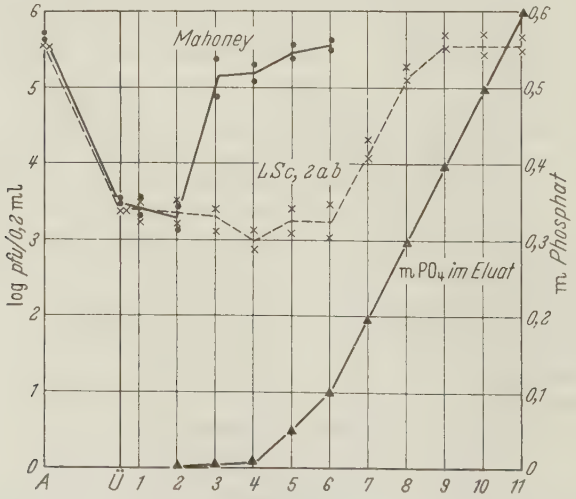


Abb. 2. Unterschiedliche Eluierbarkeit von Poliovirus Typ 1, Stämme *Mahoney* und *LSc*, 2 *a b*, bei verschiedener Molarität eines Phosphatpuffers mit schwach alkalischer Reaktion (pH 7,4). [Ordinate links: Viruskonzentration im Ausgangsmaterial (*A*), Überstand nach Adsorption (*Ü*) und in den Eluaten (*1—11* simultan); Ordinate rechts: Phosphat-Konzentration in den Eluaten]

den Autoren angegebenen Versuchsbedingungen wurde Mahoney in neutralem bis schwach alkalischem pH-Bereich quantitativ eluiert, der Stamm LSc dagegen nicht. Das Resultat des Versuches ist in Abb. 1 dargestellt.

Technik des Versuches der Abb. 1 (simultanes Verfahren). *Virus:* Poliovirus Typ I, Stämme Mahoney und LSc jeweils 1 : 10 in aq. bidest. verdünnt; *Adsorbens:* Aluminiumhydroxyd 2%ig in aq. bidest.; *Adsorption:* 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virus, p_H 7,2; Adsorptionsdauer (AD) 15 min; *Elution:* 5 ml 0,1 m Phosphatpuffer (Sörensen) unterschiedlicher p_H-Werte; Elutionsdauer (ED) 15 min. *Viruskonzentrationsbestg.:* Röhrchentest auf Affennierengewebekultur. Angaben in $\log_{10}ID_{50}$/1,0 ml.

2. Nach unseren früheren Untersuchungen[1] hängt die Elution des Poliovirus-Typ I (Stamm Mahoney) in neutralem bis schwach alkalischem Milieu unter anderem von der Phosphationen-Konzentration ab. In dem folgenden Versuch haben wir im Hinblick auf diesen Befund den Einfluß verschiedener Phosphationen-Konzentrationen auf die Elution der beiden Stämme Mahoney und LSc, 2a b untersucht. Die p_H-Werte im Elutionsmilieu wurden hierbei durch einen 0,2 m Trispuffer von p_H 7,4 konstant gehalten. Die unterschiedlichen Phosphat-Konzentrationen wurden in der Weise hergestellt, daß Phosphatpuffer nach Sörensen höherer Molarität mit dem genannten Trispuffer entsprechend verdünnt wurden. Trispuffer selbst besitzt, wie wir kürzlich mitteilten[1], keine eluierende Wirkung. Er wurde hier verwendet, um die p_H-Werte in jenen Bereichen konstant zu halten, in denen die vorhandenen Phosphationen-Konzentrationen keine Pufferungskapazität mehr besitzen.

Technik des Versuches der Abb. 2 (simultanes Verfahren). *Virus:* Polio-Virus Typ I, Stämme Mahoney und LSc, 1 : 10 in aq. bidest. verdünnt; *Adsorption:* 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virus, p_H 7,1; *Adsorbens:* Aluminiumhydroxyd 1%ig in aq. bidest.; AD: 15 min; *Elution:* 5,0 ml Phosphatpuffer-Lösungen verschiedener Molarität in 0,2 m Trispuffer, p_H 7,4; ED: 15 min; *Viruskonzentrationsbestg.:* Plaquetest auf FL-Zellen. Angaben in pfu/0,2 ml.

Wie aus Abb. 2 ersichtlich, gelang es, bei dem Stamm Mahoney bereits bei niedriger Phosphationen-Konzentration das Gleichgewicht zwischen adsorbiertem und frei suspendiertem Virus zugunsten des letzteren zu verschieben. Bei dem Stamm LSc benötigt man hierzu dagegen die 20—40fach höhere Konzentration an Phosphationen. Beide Virusstämme waren vollständig eluierbar.

3. Nachdem die Unterschiede in der Eluierbarkeit der beiden Virusstämme Mahoney und LSc, 2a b festgestellt waren, ergab sich zwangsläufig die Frage, ob dieser Unterschied Ausdruck einer unterschiedlichen Oberflächenstruktur der einzelnen Viruspartikel der beiden Stämme war oder ob vielleicht unbekannte Milieueinflüsse das verschiedenartige Verhalten der beiden Stämme bei der Elution bedingten. Der Einfluß von Milieufaktoren konnte in der bereits erwähnten früheren Veröffentlichung[1] nachgewiesen werden. Bestimmte Kationen, wie z. B. Magnesiumionen, verschieben das Gleichgewicht zwischen gebundenem und frei suspendiertem Virus. Daneben fanden wir, daß auch das Verhältnis von Menge Adsorbens zur Viruskonzentration von Einfluß auf die Elution sein kann.

Im folgenden Versuch wurden beide Virusstämme zu gleichen Teilen gemischt, das Gemisch an Aluminiumhydroxyd adsorbiert und dann sukzessiv mit Lösungen steigender Phosphat-Konzentration eluiert. Als Kontrolle wurden jeweils beide Virusstämme einzeln adsorbiert und eluiert. Das Ergebnis des Versuches ist in Abb. 3 dargestellt.

Technik des Versuches der Abb. 3 (sukzessives Verfahren). *Virus:* Poliovirus Typ I, Stämme Mahoney und LSc, jeweils 1 : 10 in aq. bidest. verdünnt, ferner ein Gemisch aus je einem Teil der beiden Virusstämme und acht Teilen aq. bidest.

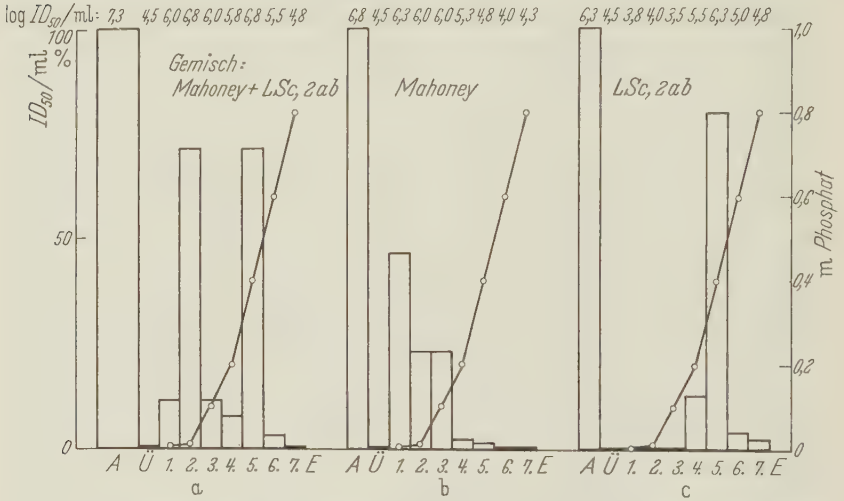


Abb. 3a—c. Sukzessive Elution der Stämme *Mahoney* (b), *LSc, 2ab* (c) und eines Gemisches beider Viren (a) von Aluminiumhydroxyd

Adsorbens: Aluminiumhydroxyd 1%ig; *Adsorption:* 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virus, p_H 7,0; AD 15 min; *Elution:* aufeinanderfolgend je 5 ml eines 0,005, 0,01, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 und 0,8 m Phosphatpuffers (Sörensen), mit p_H 7,5; ED: jeweils 30 min. *Viruskonzentrationsbestg.:* Röhrchentest auf Affennieren-Gewebekulturen, Angaben in $\log_{10} ID_{50}/1{,}0$ ml.

Aus der Abb. 3 geht hervor, daß aus dem Gemisch der beiden Stämme nach der Adsorption an Aluminiumhydroxyd Virus mit zwei deutlichen Konzentrationsmaxima eluiert wird, das eine bei einer Phosphat-Konzentration von 0,01 m, das andere bei 0,4 m. Die Summe der Viruskonzentrationen in den Eluaten steht in befriedigender Übereinstimmung mit der insgesamt zugesetzten Virusmenge, wenn man die Streubreite der hier verwendeten Titration mit einer Besetzung von vier Röhrchen pro Verdünnungsstufe in Rechnung stellt.

Vergleicht man die Elution des Virusgemisches (Abb. 3a) mit dem Verhalten der beiden Einzelkomponenten dieses Gemisches (Abb. 3b, c) im Elutionsversuch, so ergibt sich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit,

daß das Elutionsmaximum bei einer Phosphat-Konzentration von 0,01 m durch den Anteil an Mahoneyvirus in diesem Gemisch bedingt ist, während das andere Maximum dem LSc-Virus entspricht. Diese Zuordnung der beiden Elutionsmaxima zu jeweils einer Komponente des Gemisches läßt sich durch eine Untersuchung der Fähigkeit des Virus in beiden Eluaten, sich bei 40° C vermehren zu können, sichern (T-Marker, rct/40). Das LSc, 2a b-Virus vermehrt sich bekanntlich bei 40° C nicht, während bei dieser Temperatur die Vermehrung des Stammes Mahoney uneingeschränkt ist.

Tabelle 1. *Die Bestimmung des T-Markers in den beiden Eluaten Nr. 2 und Nr. 5 des in Abb. 3a dargestellten Versuches*

Virus	LSc, 2a b	Mahoney	Eluat 2	Eluat 5
Viruskonz. bei 37° C	7,0*	6,8	6,3	6,0
Viruskonz. bei 40° C	0,5	6,5	5,8	4,5
Differenz der $\log_{10}ID_{50}$/ml	6,5	0,3	0,5	1,5

* $\log_{10}ID_{50}$/ml.

Methodik. Titration der Eluate 2 (0,01 m) und 5 (0,4 m) auf Röhrchenkulturen von Affennierengewebe, Besetzung der $\log_{10}$-Verdünnungsstufen mit vier Röhrchen pro Stufe. Bebrütung der Kulturen bei 37° C und 40° C. Ablesung am 6. Tag nach Beimpfung.

Das Ergebnis des Versuches ist in Tab. 1 wiedergegeben. Das Eluat 2 enthielt danach in erster Linie Virus, welches mit der Eigenschaft T+ dem Stamm Mahoney entspricht; das Eluat 5 enthielt dagegen Virus, welches sich zum größten Teil wie der Stamm LSc verhält (T—) und sich entsprechend bei 40° C nicht vermehrt. Es braucht nicht zu überraschen, daß das Eluat 5 sich nicht wie das Originalmaterial, der Stamm LSc, als T— erweist, da dieses Eluat auch noch Anteile von Mahoneyvirus enthält, wie aus Abb. 3 leicht zu ersehen ist. Die Trennung der beiden Virusarten läßt sich durch Vermehrung der Elutionsschritte sicherlich noch verfeinern.

4. Der Unterschied der Eluierbarkeit der beiden Poliovirusstämme Mahoney und LSc, 2a b von Aluminiumhydroxyd ist nach den unter 3. angegebenen Befunden weniger durch Milieufaktoren als durch Stammeseigenschaften bedingt. Die Unterschiede zwischen den beiden Virusstämmen erwiesen sich in verschiedenen Versuchsansätzen als stets reproduzierbar. Das heißt jedoch nicht, daß die kritischen Phosphat-Konzentrationen von 0,01 m und 0,4 m sich numerisch jeweils einem Virusstamm zuordnen ließen. Auf die Höhe dieser kritischen Phosphat-Konzentration üben außer zweiwertigen Kationen, deren Bedeutung in der vorangehenden Arbeit bereits dargelegt wurde, vor allem das Verhältnis der Menge Adsorbens zur Viruskonzentration einen Einfluß aus, wie aus folgendem Versuch (Tab. 2) hervorgeht.

Technik des Versuches zu Tab. 2 (simultanes Verfahren). *Virus:* Poliovirus Stamm LSc, 2ab 1 : 10 in aq. bidest. verdünnt; *Adsorbens:* Aluminiumhydroxyd 0,5%ig und 2%ig; *Adsorption:* 1,0 ml Adsorbens + 4,0 ml Virus, p_H 7,1; AD: 15 min. *Elution:* je 5 ml Phosphatpuffer-Lösungen verschiedener Molarität: 0,1 m, 0,2 m, 0,4 m und 0,8 m; p_H 7,5; ED 15 min. *Viruskonzentrationsbestg.:* Plaquetest auf FL-Gewebe, Angaben in pfu/0,2 ml.

Tabelle 2

Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen des Adsorbens Aluminiumhydroxyd auf die maximale Elution von Poliovirus, Stamm LSc, 2ab, durch Phosphationen

Ausgangsvirus-Konzentration*: $5{,}0 \cdot 10^5$		
Phosphat-konz.	Viruskonzentration im Eluat	
	$Al(OH)_3$: 0,1%ig	$Al(OH)_3$: 0.4%ig
0,1 m	$4{,}0 \cdot 10^3$	$1{,}0 \cdot 10^3$
0,2 m	$1{,}8 \cdot 10^4$	$1{,}0 \cdot 10^3$
0,4 m	$4{,}1 \cdot 10^5$	$6{,}0 \cdot 10^4$
0,8 m	$5{,}0 \cdot 10^5$	$6{,}1 \cdot 10^5$

* pfu/0,2 ml.

Tabelle 3. *Viruskonzentrationen im Überstand nach Adsorption eines Gemisches von Mahoney und LSc, 2ab an Aluminiumhydroxyd in Gegenwart von 0,1 m Phosphationen bei p_H 7,4*

Nr.	Zusammensetzung des Ausgangsmaterial	Viruskonzentration* im Ausgangsmaterial		Viruskonzentration* im Überstand nach Adsorption
		LSc, 2a b	Mahoney	
1.	1 Teil LSc (unverd.)	$28 \cdot 10^4$	—	$7 \cdot 10^2$
	+ 9 Teile 0,1 m Puffer	$30 \cdot 10^4$		$18 \cdot 10^2$
2.	1 Teil LSc (unverd.)			
	+ 1 Teil Mahoney (unverd.)	—	$58 \cdot 10^4$	$30 \cdot 10^4$
	+ 8 Teile 0,1 m Puffer		$51 \cdot 10^4$	$45 \cdot 10^4$
3.	1 Teil LSc (unverd.)			
	+ 1 Teil Mahoney	—	$42 \cdot 10^3$	$35 \cdot 10^3$
	(1 : 10 verdünnt)		$40 \cdot 10^3$	$33 \cdot 10^3$
	+ 8 Teile 0,1 m Puffer			
4.	1 Teil LSc (unverd.)			
	+ 1 Teil Mahoney	—	$49 \cdot 10^2$	$42 \cdot 10^2$
	(1 : 100 verdünnt)		$31 \cdot 10^2$	$32 \cdot 10^2$
	+ 8 Teile 0,1 m Puffer			

* pfu/0,2 ml.

5. Der Unterschied im Verhalten der beiden Virusstämme läßt sich selbstverständlich nicht nur in Elutionsversuchen aufzeigen. Wir haben im folgenden Gemische von LSc-Virus und Mahoneyvirus mit jeweils abgestuften Konzentrationen der letzteren Komponente in Gegenwart von Phosphationen an Aluminiumhydroxyd adsorbieren lassen. Die

Phosphat-Konzentration wurde so gewählt, daß auf Grund der vorhergehenden Experimente das Adsorptionsgleichgewicht für Mahoney auf der Seite der Elution, für das LSc-Virus auf der Seite der Adsorption zu liegen kam. Aus Tab. 3 geht hervor, daß die im jeweiligen Überstand gemessene Viruskonzentration genau der der eingegebenen Konzentration an Mahoneyvirus entspricht. Man kann daraus wohl den Schluß ziehen, daß es gelingt, die beiden Virusstämme auch im Adsorptionsversuch voneinander zu trennen.

Technik des Versuches zu Tab. 3. *Virus:* Poliovirus Typ I, Stämme Mahoney und LSc, 1 : 10 in 0,1 m Phosphatpuffer verdünnt; Gemische aus 1 : 10 verdünntem LSc mit 1 : 10, 1 : 100 und 1 : 1000 in 0,1 m Phosphatpuffer (p_H 7,4) verdünntem Mahoney; *Adsorbens:* Aluminiumhydroxyd 2%ig; *Adsorption:* 4,0 ml Virus + 1,0 m Adsorbens, AD: 15 min. *Viruskonzentrationsbestg.:* Plaquetest auf FL-Gewebe, Angaben in pfu/0,2 ml.

6. Während man sich vom unterschiedlichen Verhalten der beiden Stämme LSc, 2ab und Mahoney in bezug auf Adsorption und Elution ohne Schwierigkeiten überzeugen kann, ist die Deutung dieser Befunde etwa im Hinblick auf mögliche Unterschiede in der Oberflächenstruktur

Tabelle 4. *Die Elution von Poliovirus Typ 1 (Stämme Mahoney und LSc, 2ab) von Aluminiumhydroxyd durch ÄDTA*

Virusstamm	Konz. im Ausgangsmaterial	Konz. im Überstand	Konz. im Eluat bei				
			—	0,05 m	0,1 m	0,15 m	0,2 m ÄDTA
Mahoney	7,3	4,3	5,0	7,0	7,3	6,5	7,0
LSc	6,8	4,5	4,3	5,0	5,0	6,0	5,8

der Viruspartikeln nicht ohne weiteres möglich. Da aus unseren früheren Versuchen[1] bekannt war, daß Magnesiumionen die Adsorption beeinflussen, erschien es interessant, die Eluierbarkeit dieser beiden Virusstämme durch Metallkomplexbildner wie ÄDTA zu untersuchen. Das Ergebnis eines solchen Versuches ist in Tab. 4 wiedergegeben. Es zeigt, daß ähnlich wie bei den Versuchen mit Phosphatlösungen Konzentrationen an ÄDTA, die zu einer vollständigen Elution des Mahoneyvirus führen, nur eine sehr geringe Elution des adsorbierten LSc-Virus bewirken.

Technik des Versuches zu Tab. 4 (simultanes Verfahren). *Virus:* Poliovirus Typ I, Stämme Mahoney und LSc, 1 : 10 in aq. bidest. verdünnt; *Adsorbens:* Aluminiumhydroxyd 1%ig; *Adsorption:* 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virus; AD: 15 min, p_H 7,1; *Elution:* 5 ml einer ÄDTA-Lösung (Titriplex III-Merck) mit abgestuften Konzentrationen in aq. bidest., p_H mit 1/10 n NaOH auf 7,7 abgestimmt; ED: 15 min; *Viruskonzentrationsbestg.:* Röhrchentest auf Affennieren-Gewebekulturen, Angaben in ID_{50}/1,0 ml.

7. In einigen weiteren Versuchen strebten wir die Aufnahme von Adsorptionsisothermen der beiden Stämme Mahoney und LSc, 2ab in

schwach alkalischem Milieu an. Abb. 4 gibt die erhaltenen Befunde wieder. Bei einer Darstellung der Virus-Konzentrationen im doppelt logarithmischen System ließ sich unter den Bedingungen unserer Versuche kein Unterschied zwischen den beiden Virusstämmen feststellen. Die Untersuchungen wurden jedoch in einem Bereich durchgeführt, in dem das Adsorbens noch in einem deutlichen relativen Überschuß vorhanden war. Wir halten deshalb diese Ergebnisse noch nicht für schlüssig und weitere Versuche für notwendig.

Technik des Versuches zu Abb. 4. *Virus:* Poliovirus Typ I, Stämme Mahoney und LSc, 1 : 10 verd. in 0,2 m Trispuffer, p_H 7,4; *Adsorbens:* Aluminiumhydroxyd 0,1%ig in aq. bidest., nach den in vorhergehender Arbeit mitgeteilten Befunden (siehe Abbildung) liegt diese Konzentration an der Grenze des maximalen Bindungsvermögens. *Adsorption:* 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virus, p_H 7,4; AD: 15 min; *Viruskonzentrationsbestg.:* Plaquetest auf FL-Zellen, Angaben in pfu/0,2 ml.

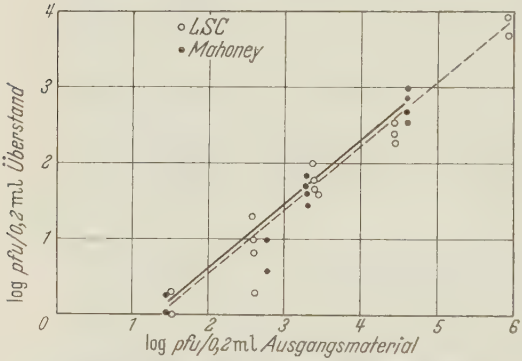


Abb. 4. Die Adsorption von Poliovirus Typ 1 (Stämme *Mahoney* und *LSc*, 2a b) an Aluminiumhydroxyd

8. Abschließend haben wir die Frage untersucht, ob der Adsorption und Elution über die beiden Poliovirus Typ I Stämme Mahoney und LSc hinausgehend eine allgemeine differenzierende Bedeutung zukommt. Hierzu untersuchten wir eine Reihe bekannter Virusstämme verschiedener Serotypen auf ihre Eluierbarkeit von Aluminiumhydroxyd. Von besonderem Interesse erschien uns hierbei ein Vergleich des Verhaltens im Elutionstest mit einigen genetischen Merkmalen (Marker) dieser Virusstämme. Die Resultate dieser Versuche sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Technik des Versuches zu Tab. 5 (simultanes Verfahren). *Virus:* Die benutzten Virusstämme ergeben sich aus Tab. 5 (unter Material und Methoden näher beschrieben) und wurden jeweils 1 : 10 in aq. bidest. verdünnt; *Adsorbens:* Aluminiumhydroxyd 1%ig; *Adsorption:* 0,25 ml Adsorbens + 2,25 ml Virus, p_H 7,1—7,3; AD: 15 min. *Elution:* 2,5 ml Phosphatlösungen verschiedener Konzentration; p_H 7,5; ED: 15 min. *Viruskonzentrationsbestg.:* Röhrchentest auf Affennieren-Gewebekulturen, Besetzung vier Röhrchen pro Verdünnungsstufe, Angaben in $\log_{10} ID_{50}$/1,0 ml.

T-Test. Viruskonzentrationsbestg. der benutzten Virusstämme bei Inkubation bei 37° C und 40° C. Besetzung der $\log_{10}$-Verdünnungsstufen mit jeweils vier Röhrchen. Ablesung am 5. Tag. Angaben in $\log_{10}$, Titerdifferenzen zwischen dem bei 40° C und bei 37° C bebrüteten Material.

d-Test. Feststellung der $\log_{10}$pfu/0,2 ml bei Verwendung eines overlays mit niedrigem (0,075%) und eines mit hohem (0,45%) $NaHCO_3$-Gehalt. Ablesung am

4. Tag nach Beimpfung. Angaben in $\log_{10}$-Differenzen der Plaquezahl unter overlay mit hohem und niedrigem Bicarbonatgehalt[4].

MS-Test. Viruskonzentrationsbestg. im Röhrchentest auf MS-Zellen, Besetzung: vier Röhrchen pro Verdünnungsstufe, Ablesung am 6. Tag nach Beimpfung. Angaben in $\log_{10}$-Titerdifferenzen zwischen dem Titer auf MS-Zellen und dem auf Affennierenzellen ermittelten[11].

Bei Beobachtung der in Tab. 5 zusammengestellten Ergebnisse fällt ein deutlicher Unterschied zwischen den Serotypen auf. Bei den Stämmen des Typ I erfolgt die Elution relativ scharf bei niedriger oder aber bei hoher Phosphat-Konzentration. Die Elution bei den Stämmen des Typ II und III verläuft dagegen viel schleppender. Die Ausgangs-Konzentration wird zwar im allgemeinen erst bei einer Phosphat-Konzentration von etwa 0,1 m erreicht, ein Teil der eingegebenen Virusmenge aber bereits bei einer Konzentration von 0,01 m Phosphat eluiert. Diese Virusstämme nehmen also nach ihrem Verhalten im Elutionstest eine Zwischenstellung zwischen dem

Tabelle 5. *Elution verschiedener Polio-Virusstämme von Aluminiumhydroxyd*
Vergleich des Verhaltens im Elutionstest mit einzelnen genetischen Markern

Virusstamm	T-Marker[+]	d-Marker[+]	MS-Marker[+]	Ausgangs-konzentration	Ü	Eluate				
						0,01 m	0,05 m	0,1 m	0,5 m	0,8 m
Mahoney	0,3 T+	0,1 d+	0,3 MS+	6,5	3,8	6,5	—	6,5	—	—
LSo	6,5 T−	2,2 d−	5,0 MS−	6,5	4,5	4,0	3,5	5,3	6,3	—
Brunhilde	—	—	—	6,0	—	6,9	—	5,3	—	5,8
Lederle-SM	6,0 T−	−0,6 d+	2,0 MS±	6,5	—	—	6,3	6,0	6,3	6,0
Chat	6,5 T−	2,1 d−	3,3 MS−	6,8	4,0	6,5	6,0	6,3	6,5*	—
MEF_1	0,7 T+	0,3 d+	0,8 MS+	7,0	5,0	5,3	5,8	6,5	7,0	7,0
P 712	6,5 T−	2,7 d−	3,6 MS−	6,8	4,5	5,5	6,3	6,5	6,8	—
Lederle-MEF_1	5,0 T−	1,0 d±	4,8 MS−	6,8	4,0	4,8	4,8	5,3	6,3	6,3
Saukett	0,5 T+	—	3,3 MS−	6,3	3,3	4,0	4,0	5,0	6,3	6,3
Leon (Sabin)	6,5 T−	2,2 d−	4,0 MS−	7,5	4,8	5,5	5,8	7,0	7,3	7,5
Lederle-Fox	6,0 T−	1,0 d±	4,0 MS−	6,5	3,0	5,0	5,8	5,8	6,3*	6,3
WFX	5,2 T−	2,4 d−	3,7 MS−	7,0	4,0	6,8	6,8	6,8	6,5*	6,2

[+] Erklärung siehe Text. — * 0,6 m.

Elutionstyp des Stammes Mahoney und des Stammes LSc ein. Wieweit diese Art der Elution Ausdruck einer Inhomogenität der Viruspopulationen ist, muß weiter geklärt werden.

Es ergibt sich aus diesen Befunden, daß zwischen den sonstigen untersuchten Eigenschaften, den Markern T, d und MS und dem Verhalten der Virusstämme im Elutionstest keine Korrelation besteht. T—Stämme wie der Stamm SM oder Chat verhalten sich im Adsorptionstest wie Mahoney mit der Eigenschaft T+; auch zwischen dem Vorhandensein oder Fehlen der Eigenschaft d oder MS und dem Elutionstyp ergab sich keine Konkordanz. Diese Untersuchungen müssen für eine endgültige Klärung jedoch noch erweitert werden.

Besprechung der Ergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß sich die beiden Poliovirusstämme Mahoney und LSc, 2ab in bezug auf die Elution durch Phosphatlösungen aus einem Adsorbat an Aluminiumhydroxyd verschieden verhalten und auf diese Weise unterschieden werden können. Der Stamm Mahoney wird schon bei einer Phosphationen-Konzentration von 0,01 m in schwach alkalischem Milieu eluiert, LSc dagegen unter den gleichen Bedingungen erst bei einer Phosphat-Konzentration von 0,4 m. Beide Virusstämme können quantitativ adsorbiert und eluiert werden.

In Ergänzung zu den Befunden von Robbins u. a.[8] wurde gefunden, daß der Unterschied der Eluierbarkeit zwischen den beiden Virusstämmen nicht allein vom p_H-Wert des Elutionsmilieus, sondern vor allem von der Konzentration von Phosphationen in diesem Milieu abhängt. Das Verfahren der Adsorption mit nachfolgender Elution durch Phosphatlösungen verschiedener Konzentration wurde vor einigen Jahren von Schlesinger u. Miller[7] zur Typisierung von Influenzavirusstämmen verwendet, wobei Aluminiumphosphat als Adsorbens benutzt wurde.

Unsere Befunde warfen die Frage auf, ob der Unterschied in der Eluierbarkeit der benutzten Poliovirusstämme durch Eigenschaften der Viruspartikeln selbst oder aber durch Milieufaktoren — sei es im Vermehrungsmedium des Virus oder auch in der Elutionsflüssigkeit — bedingt ist. Die Unterschiede zwischen den beiden Stämmen Mahoney und LSc beruhen nach unseren Untersuchungen auf Eigenschaften der benutzten Virusstämme, da es mit Hilfe des angegebenen Verfahrens möglich war, sie aus einem Gemisch, d. h., dem für beide Virusarten gleichen Milieu zu trennen. Es erscheint dagegen nicht möglich zu sein, die für die maximale Elution notwendige minimale Phosphationen-Konzentration in ihrem rein numerischen Wert in eine bestimmte Beziehung zu den Virusstämmen zu setzen. Die Höhe dieser Konzentration

kann durch verschiedene Faktoren beeinflußt werden, vor allem durch das Verhältnis der Menge des Adsorbens zur Konzentration des Virus und durch das Ionenmilieu. Verwendet man das Adsorptions- und Elutionsverhalten zur Charakterisierung dieser Virusstämme, so muß man diese Verhältnisse berücksichtigen und entsprechende Kontrollen bei den Untersuchungen mitführen.

Es ist noch nicht möglich, zu sagen, worauf das unterschiedliche Verhalten der Stämme Mahoney und LSc, 2ab beruht. Berücksichtigt man, daß das Aluminiumhydroxyd unter den Bedingungen unserer Versuche vorwiegend negativ geladen ist, so erscheint es denkbar, daß die offensichtlich festere Bindung des Stammes LSc an das Aluminiumhydroxyd auf dem Besitz einer stärker positiven Ladung seiner Viruspartikeln gegenüber jenen des Stammes Mahoney beruht. Die Tatsache, daß Kationen wie Magnesium die Adsorption fördern, spricht dafür, daß diese Ionen die Adsorption störende negative Ladungen an der Oberfläche der Viruspartikeln zu neutralisieren vermögen. Durch relativ geringe Konzentrationen von Metallkomplexbildnern (ÄDTA) gelang es, das Milieu so zu verändern, daß sich das Adsorptionsgleichgewicht für den Stamm Mahoney zugunsten der Elution verschiebt.

Schließlich haben wir das Verfahren auf andere Poliovirusstämme übertragen. Es erscheint uns wesentlich, in diesem Zusammenhang daran zu erinnern, daß die unterschiedliche Neurovirulenz von Poliovirusstämmen durchaus nicht mit anderen in vitro feststellbaren Eigenschaften dieser Stämme korreliert sein muß. Wir haben das Verhalten verschiedener Poliovirusstämme im Adsorptionstest mit den in vitro feststellbaren Eigenschaften T, d und MS verglichen. Hierbei ergab sich, daß Poliovirusstämme sich in ihrer Eluierbarkeit aus einem Adsorbat an Aluminiumhydroxyd sehr unterschiedlich verhalten können. Für die eine Verhaltensweise kann der Stamm Mahoney als Prototyp gelten, bei dem eine maximale Elution bereits bei sehr niedriger Phosphat-Konzentration erfolgt. Daneben gibt es Stämme, die erst bei hohen Phosphat-Konzentrationen quantitativ eluiert werden. Hierfür ist der Stamm LSc ein Beispiel. Schließlich findet sich ein Verhalten, wie man es vor allem bei den Stämmen der Serotypen II und III antrifft, das durch eine schleppende Elution mit quantitativer Elution bei mittleren Phosphat-Konzentrationen gekennzeichnet ist. Es erscheint denkbar, daß letzteres Verhalten Ausdruck einer Inhomogenität der betreffenden Virusstämme ist, wobei ein beträchtlicher Teil schon bei geringer Phosphat-Konzentration eluiert, der größere Anteil jedoch erst bei höherer Konzentration.

Eine Korrelation zwischen dem Verhalten der Poliovirusstämme im Adsorptionstest und sonstigen in vitro feststellbaren Eigenschaften der Stämme fanden wir nicht. So verhielten sich die Typ I-Stämme Chat

und Lederle-SM in ihrer Eluierbarkeit von Aluminiumhydroxyd wie Mahoney, beide wiesen jedoch die Eigenschaft T— auf. Ebenfalls fanden wir zwischen den verschiedenen Stämmen der Typen II und III keine sicheren Unterschiede, gleichgültig, welche sonstigen Eigenschaften sie aufweisen. Diese fehlende Korrelation zwischen dem Verhalten im Adsorptionstest und anderen in vitro feststellbaren Eigenschaften betrifft nicht nur den T-Marker, sondern — wie aus Tab. 5 hervorgeht — auch die Marker d und MS. Diese fehlende Korrelation weist darauf hin, daß zwischen der Neurovirulenz der untersuchten Stämme und ihrem Verhalten im Adsorptionstest kein direkter Zusammenhang besteht, da es sich bei einem Teil dieser Stämme um bekannte abgeschwächte Poliovirusstämme handelt, deren Neurovirulenz von zahlreichen Autoren untersucht wurde. Es erscheint nach diesen Befunden nicht angängig, das Verhalten eines Poliovirusstammes im Adsorptionstest als Kriterium der Neurovirulenz zu werten.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen, über die vorstehend berichtet wird, haben ergeben, daß die Adsorption und Elution der Poliovirusstämme Mahoney und LSc, 2ab an bzw. von Aluminiumhydroxyd von der Phosphat-Konzentration der Adsorptions- bzw. Elutionsflüssigkeit abhängt. In schwach alkalischem Milieu wird Mahoneyvirus schon bei geringen Phosphat-Konzentrationen eluiert (0,01 m), während LSc-Virus unter sonst gleichen Bedingungen erst bei einer 20—40fach höheren Konzentration quantitativ wiedergewonnen wird. Es gelingt mit Hilfe des Verfahrens, beide Virusstämme aus einem Gemisch zu trennen. Das Verhältnis zwischen Konzentration des Adsorbens und des Virus wirkt sich auf den absoluten Wert der für eine maximale Elution minimal ausreichenden Phosphat-Konzentration aus. Das gleiche gilt für die Anwesenheit von Magnesiumionen. Der Unterschied in der Eluierbarkeit beider Viren kommt auch bei der Elution der Viren mit Hilfe von Metallkomplexbildnern zum Ausdruck. Bei Anwendung des Verfahrens auf eine Reihe von Virusstämmen verschiedenen Serotyps, deren Neurovirelenz zum Teil bekannt ist und deren T-, d- und MS-Marker kontrolliert wurden, konnte festgestellt werden, daß das Verhalten im Adsorptionstest nicht mit der Neurovirulenz für Affen und den Markern T, d und MS korreliert ist. Es ergab sich bei den untersuchten Virusstämmen eine Reihe unterschiedlicher Elutionstypen.

Literatur

[1] Haas, R., R. Thomssen, G. Maass u. A. Gieseler: Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. 1. Mitteilung: Untersuchungen über die Adsorption und Elution von Polioviren unter Verwendung von Aluminiumhydroxyd als Adsorbens. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 1 (1961).

[2] Hodes, H. L., H. D. Zepp and E. Abender: A physical property as a virus marker. Difference in avidity of cellulose resin for virulent (Mahoney) and attenuated (LSc, 2ab) strain of type 1 poliovirus. Virology **11**, 306 (1960).

[3] Hoyer, G. H., E. T. Bolton, R. A. Ormsbee, G. Ritter, D. B. Ritter and C. L. Larson: Mammalian viruses and rickettsiae. Their purification and recovery by cellulose anion exchange columns has significant implications. Science **127**, 859 (1958).

[4] Hsiung, G. D., and J. L. Melnick: Effect of sodium bicarbonate concentration in plaque formation of virulent and attenuated polioviruses. J. Immunol. **80**, 282 (1958).

[5] Lwoff, A.: Factors influencing the evolution of viral diseases at the cellular level and in the organism. Bact. Rev. **23**, 109 (1959).

[6] McBride, W. D.: Antigenic analysis of polioviruses by kinetic studies of serum neutralization. Virology **7**, 45 (1959).

[7] Miller, H. K., and R. W. Schlesinger: Differentiation and purification of influenza viruses by adsorption on aluminium phosphate. J. Immunol. **75**, 155 (1955).

[8] Robbins, Fr. C.: Diskussionsbemerkung in Live poliovirus vaccines. Papers presented at the second intern. conf. on live poliovirus vaccines p. 45 (1960).

[9] Vogt, M., R. Dulbecco and H. A. Wenner: Mutants of poliomyelitis viruses with reduced efficiency of platings in acid medium and reduced neuropathogenicity. Virology **4**, 141 (1957).

[10] Willstätter, R., u. H. Kraut: Zur Kenntnis der Tonerdehydrate. 1. Mitt. Ber. dtsch. chem. Ges. **56**, 149 (1923), 2. Mitt. Ber. dtsch. chem. Ges. **57**, 58 (1924).

[11] Kanda, Y., and J. L. Melnick: In vitro differentiation of virulent and attenuated polioviruses by their growth characteristics on MS cells. J. exp. Med. **109**, 9 (1959).

Professor Dr. R. Haas,
Hygiene-Institut der Universität, Freiburg, Hermann Herder-Straße 15

Zeitschrift f. Hygiene 148, 28—38 (1961)

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Bonn
(Direktor: Professor Dr. med. H. Elbel)

Erfahrungen mit der Hitzeeinwirkung von 70° C bei der Herstellung von Anti-N-Testseren

Von
Ulrich Heifer

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 22. Juli 1961)

Obwohl das Bemühen, durch Modifikation des Verfahrens von Landsteiner u. Levine (1, 2, 3) bessere Ergebnisse in der Gewinnung von Anti-M- und Anti-N-Immun-Testseren zu erzielen, stets sehr rege war [Arai; Blaurock; Crome; Dahr (1, 2); Davidsohn u. Rosenfield; Krah (1, 2); Künkele; Laubenheimer; Levine; Olbrich (1, 2); Pietrusky; Püschel; Rasch; Schiff (1, 2, 3); Steffan], sind doch in der Herstellungspraxis bis heute noch gewisse Qualitätswünsche schwer erfüllbar geblieben. Kernpunkte einschlägiger Arbeiten sind Fragen nach zweckmäßiger Tierauswahl für eine möglichst gewinnreiche Immunisierung, nach optimalen Immunisierungsmethoden und Absorptionsverfahren, die eine höchstmögliche Reinheit und Wertigkeit der Testseren erzielen lassen. Seit je gelten die Klagen sachkundiger Autoren der oft unbefriedigenden Titerausbeute und der Schwierigkeit, die Rohseren von unerwünschten gruppen-, faktoren- und artspezifischen Agglutininen zu säubern.

Gelingt es auch — unter Titerverlust — durch Absorptionen störende Agglutinine weitgehend auszuschalten, so zeigen Kontrolltitrationen doch nicht selten unspezifische Reaktionen, die dem Erfahrenen zwar meist keine Schwierigkeiten bereiten, aber einen Verstoß gegen die berechtigte Forderung nach absoluter Reinheit der Seren darstellen.

Verbesserungsvorschläge zum Absorptionsverfahren werden sich im wesentlichen auf folgende Punkte beziehen müssen:

1. Ermöglichung elektiver Reinigung bei möglichst geringer Einengung des spezifischen Titers;

2. weitgehende Vermeidung unspezifischer Mitabsorption durch Merkmalsverwandtschaft (Andresen; Kindler) oder unspezifische Absorptionsmethoden;

3. Vereinfachung und Verkürzung des Absorptionsvorganges (Vermeidung titersenkender Vielfachabsorptionen, Verbrauch möglichst geringer Absorptionsblutmengen);

4. Anwendung von Absorptionsmethoden, die eine diagnostische Verwendung der Seren bei Zimmertemperatur zulassen;

5. Herstellung von Seren, die auch schwache Merkmale anzeigen.

Wir untersuchten die Verwendbarkeit der Hitzeanwendung bei der Absorption nach Menolasino, Davidsohn u. Lynch unter diesen Gesichtspunkten.

Methode

Angeregt durch die Beobachtungen von Beyer u. Reach, Jones und Rowe u. Fulton, die von der Thermolabilität des bakteriellen O-Agglutinins und der Thermostabilität des bakteriellen H-Agglutinins in Kaninchenseren berichten, versuchten die Autoren, die bisher geläufigen, mühsamen, zeitraubenden und kostspieligen Methoden durch Anwendung einer höheren Temperatur bei der Absorption zu ersetzen. Sie gingen von der Feststellung aus, daß mit Kochsalzlösung verdünntes Serum bei Erhitzen auf Temperaturen von 65—75° C während einer begrenzten Zeit nicht koaguliert. Die Hitzeeinwirkung erfolgt in vorgewärmten Pyrex-Glasröhrchen im Wasserbad unter öfterem Schütteln der Gefäße. Agglutinine für die Blutgruppen A, B, O in Kaninchen-Immunseren wurden durch Erhitzen auf 70° C über 60 min vollständig zerstört; dagegen erwies sich ihnen der Anti-Mensch-Globulin-Antikörper unter gleichen Bedingungen als thermostabil.

Zur Erprobung der Nutzbarkeit dieses Effektes bei der Gewinnung von Coombs-Seren verwendeten die Autoren 15 verschiedene, unabsorbierte Anti-Mensch-Globulin-Seren von Kaninchen. Jeder Teil des Serums wurde mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 10 verdünnt und zur Untersuchung auf Heteroagglutinine mit menschlichen Blutkörperchen der Gruppen A, B, O titriert. Alle geprüften Seren enthielten Hämagglutinine und zeigten nach der Hitzeeinwirkung (70° C, 60 min) eine totale Auslöschung dieser Titer (1 : 1 bis 1 : 16). Nach dem Erhitzen wurde jedes Serum gegen Rh-positive Zellen titriert, die mit verschiedenen Verdünnungen von Anti-Rh_0-Seren sensibilisiert waren. Es zeigte sich, daß Spezifität und Titerhöhe der Seren nicht beeinträchtigt wurden.

Dieser Effekt wurde zunächst bei der Herstellung von Coombs-Seren (Menolasino u. Davidsohn) genutzt. Später wurde versucht, das Verfahren auch bei der Gewinnung von Anti-M- und Anti-N-Immuntestseren anzuwenden:

Nicht vorbehandeltes Kaninchen-Anti-N-Serum wurde im Verhältnis 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und nach den Angaben von Davidsohn u. Rosenfield mit ON, OMN, AM und OM-Erythrocyten austitriert (Tab. 1 a). Das verdünnte Serum wurde zusätzlich über 60 min bei 70° C gehalten und dann ebenfalls titriert (Tab. 1 b). Schließlich wurde die Absorption des verdünnten Serums bei Zimmertemperatur mit einer Mischung von AM-, BM-, OM-Erythrocyten zur Hämagglutininbeseitigung durchgeführt. Die Verdünnung des nicht erhitzten Serums wurde mit einem gleichen Volumen AM-Blutkörperchen absorbiert. Nach den Erfahrungen von Davidsohn u. Rosenfield wäre ein Anti-M-Titerverlust zu erwarten gewesen, aber auch ein geringes Sinken des Anti-N-Titers bei einer Titration mit ON-Zellen (Tab. 1 c).

Da die neben dem heterologen Anti-N auch immer mitgebildeten Antikörper für M entfernt werden mußten, wurden diese aus dem verdünnten und erhitzten Serum durch Absorption mit einer Sorte von M-Erythrocyten isoliert. Das geschah am besten mit einem gleichen Volumen von dreimal gewaschenen AM-Zellen (Absorptionseffekt siehe Tab. 1 d). Letzte Reste störenden Anti-M-Agglutinins waren durch Nachabsorption mit dem halben Volumen AM-Erythrocyten entfernt worden (Tab. 1 e). — Sinngemäß soll mit Anti-M-Seren verfahren werden.

Tabelle 1. *Vergleichende Studie über den Effekt des Erhitzens und Absorbierens auf die heterologen Hämagglutinine in einem Anti-N-Serum*
(Menolasino, Davidsohn and Lynch: A simplified method for the preparation of anti-M- and anti-N-typing sera)

Behandlung des Serums		a $-H^{x}$ $-A^{+}_{+}$	b $+H^{+}$ $-A$	c $-H$ $+A$ §	d $+H$ $+A$//	e $+H$ $+A$''
Zelltyp	ON	128**	128	16	16	8
	OMN	128	64	8	8	4
	AM	128	128	2	0	0
	BM	64	32	4	1	0
	OM	64	64	4	0	0

Zeichenerklärung zu Tab. 1: a = Versuchsabschnitt a. $-H$ = Serum nicht erhitzt. $+H$ = Serum 1 Std auf 70° C erhitzt. $-A^{+}_{+}$ = Serum nicht absorbiert. $+A$§ = Serum nicht erhitzt, jedoch absorbiert mit AM-Erythrocyten. $+A$// = Erste Absorption des erhitzten Serums mit AM-Zellen. $+A$'' = Zweite Absorption des erhitzten Serums mit AM-Zellen.
** Titer des Serums = reziproker Wert der Serumverdünnung.

Die Autoren sehen in der Anwendung der Methode folgende Vorteile:

1. Wegfall der Notwendigkeit, Seren mit mehr als einem Zelltyp zu absorbieren (und eines zusätzlichen Absorbierens bei 56° C);
2. Zeiteinsparung bei dem Waschen der Absorptionserythrocyten;
3. Erhöhung der Absorptions-Rentabilität;
4. Vereinfachung von Probeabsorptionen.

Material und Durchführung

Zur Immunisierung der 6—8 Monate alten Kaninchen wurden ON-Erythrocyten verwendet, die ganz frisch oder nur wenige Tage im Eisschrank bei + 5° C aufbewahrt wurden. Das von den Spendern erhaltene Blut wurde jeweils nach einem ersten Zentrifugieren zwei- bis dreimal 8 min lang in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und nach jeder Reinigung erneut in der Zentrifuge sedimentiert bis zur Wasserklarheit der überstehenden Kochsalzlösung. — Die Immunisierung der Tiere erfolgte durch Injektion von Kochsalzaufschwemmungen des ON-Blutes (Verhältnis Blkp. Sediment: physiol. NaCl-Lösung = 2 : 5 bis 3 : 5) in die Ohrrandvenen der Tiere jeden 2.—3. Tag; je nach dem Ergebnis der Probeabsorptionen erhielten die Tiere 9—20 Injektionen.

Nach Immunisierung, Durchführung von Probeabsorptionen und Entbluten der Kaninchen wurden die Rohseren durch Sedimentierung der Blutkörperchen und Abhebern des überstehenden Serums gewonnen und schließlich im Verhältnis 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die so vorbereiteten Seren wurden in paralleler Versuchsanordnung jeweils entweder bei Zimmertemperatur belassen oder durch Temperatureinwirkung (56° C über 30 min und 70° C über 60 min) weiterbehandelt. Anschließend erfolgte bei den erhitzten Seren die Einstellung auf Zimmertemperatur durch vorsichtige Wasserkühlung und Stehenlassen bei ZT, bei der auch die Absorption mit dreimal gewaschenen A_1M-Blutkörperchen vorgenommen wurde [Dahr (2); Menolasino, Davidsohn, Lynch]. Zwischen den einzelnen Absorptionsphasen wurde das Absorptionsgemisch jeweils 1,5 min lang

zentrifugiert und das Serum abgehebert. — Die Herstellung der Verdünnungsreihen erfolgte in kleinen Glasröhrchen, die nach Schütteln des Absorptionsgemisches und einer Pause von 5 min wiederum 1,5 min lang zentrifugiert wurden. Die Titerbeurteilung wurde durch Beklopfen der Röhrchen und quantitative Bewertung der vorliegenden Agglutinate ausgeführt [Dahr (2)]:

Bei leichtem Beklopfen eines Röhrchens tritt auf:

1. kein Zerfall des Agglutinates +++;
2. Zerfall des Agglutinates in 2—3 kompakte Teile ++;
3. Zerfall des Agglutinates in viele kleine Teile +;
4. völlige Auflösung des Agglutinates —.

Die angegebenen Zahlenwerte kennzeichnen den Titer, bei dem die geringste positive Reaktion (+) beobachtet wurde.

Ergebnisse

Zur Charakterisierung der Absorptionsbedingungen und Titrationsergebnisse bei fünf verschiedenen Kaninchenseren seien diese Daten für das Serum II tabellarisch dargestellt:

Tabelle 2. *Absorptionsbedingungen/Serum II*

Av.	1:10			1:20			1:40		1:60		1:80	
Abs. Nr.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Abs. Verh.	1:2	1:2	1:1	1:2	1:2	1:1	1:2	1:2	1:2	1:1	1:2	1:1
Dauer[1]	40	60	45	40	60	40	40	60	40	45	40	45

Absorption bei + 5° C

Av.	1:10	1:20	1:40	1:60	1:80
Abs. Verh.	1:6	1:6	1:6	1:3	1:3
Dauer[2]	5	4	3	2,5	2,5

Verwendetes Absorptionsblut: A_1M (Fl.)[3]. Testblute: OM (St. I) und ON (St. II). Dauer des Zentrifugierens nach jeder Absorption: 1,5—2 min.

Erläuterung: Abs. Nr. = Anzahl der Absorptionen. Abs. Verh. = Verhältnis des unverdünnten Serums zur Absorptionsblutmenge.

[1] Dauer in Minuten.

[2] Dauer in Stunden.

[3] Blutspender.

Besprechung der Ergebnisse

Während der Immunisierung der Kaninchen konnte eine Witterungsabhängigkeit der Verträglichkeit von Blutaufschwemmungs-Injektionen (Wildführ) insofern bestätigt werden, als in den Versuchsmonaten März und April bei Auftreten hoher Luftfeuchtigkeit und relativ hoher Temperaturen — bei ausgesprochen schwülem Wetter — regelmäßig eine erhöhte Empfindlichkeit der Tiere gegenüber den gleichen Mengen des gleichen Blutes beobachtet wurde. Diese schwankende Empfindlichkeit wirkte sich öfters zwingend auf die Dosierung der Injektionen aus. Unter höchst ungünstigen Bedingungen wurde der Eintritt anaphylaktischer Reaktionen gesehen.

Verbietet sich auch eine Verwendung hämolytischen Blutes für die Immunisierung, so hat es sich doch nicht als obligatorisch erwiesen, bei jeder Injektion ganz frisches Blut zu nehmen. Die sedimentierten, zwei- bis dreimal gewaschenen und im physiologischen Verhältnis mit

Tabelle 3. *Titrationsergebnisse/Serum II*

	Av.	1:10		1:20		1:40		1:60		1:80	
		N	M	N	M	N	M	N	M	N	M
n. abs.	ZT	128	32	32	16	32	8	16	4	8	2
	56°	128	32	32	16	32	8	16	4	8	2
	70°	64	16	32	4	16	4	8	2	4	1
1 mal	ZT					16	2	8	1	4	0
	56°					8	1	8	1	4	0
	70°					4	0	4	0	2	0
2 mal	ZT	32	2	16	1	4	0	4	0		
	56°	32	2	8	0	4	0	4	0		
	70°	16	1	8	0	2	0	2	0		
3 mal	ZT	16	1	4	0						
	56°	16	1	4	0						
	70°	8	0	4	0						
abs. bei + 5° C	ZT	16	1	4	0	4	0	2	0	2	0
	56°	16	1	4	0	4	0	2	0	2	0
	70°	8	0	2	0	2	0	2	0	1	0

Erläuterung: n. abs. = nicht absorbiert. 1 mal, 2 mal, 3 mal = Anzahl der Absorptionen. abs. bei + 5° C = Absorption erfolgte bei + 5° C im Eisschrank.

Kochsalzlösung aufgeschwemmten Erythrocyten konnten bei Aufbewahrung im Eisschrank bei + 5° C ohne Nachteil über 5 Tage brauchbar erhalten werden. Das in dieser Weise präparierte Blut hat niemals bei den Tieren zu Komplikationen geführt.

Von besonderer Bedeutung für die Qualität der Testseren ist die Technik der Serumverdünnung, die in angemessenem Maße vor oder nach der Absorption eines Serums vorgenommen wird. Wir halten es für zweckmäßig, von jedem Serum vor der Reinigung durch Absorption verschiedene Verdünnungen im Bereich von 1 : 10 bis 1 : 80 herzustellen, um die günstigste Absorptionsverdünnung zu ermitteln. Wir geben einer optimalen Verdünnung vor der Absorption den Vorzug, während es einer Verdünnung nach der Absorption vorbehalten bleiben sollte, Spuren verbliebener Unspezifität zu beseitigen, die man wegen der Gefahr einer Erniedrigung des spezifischen Titers nicht durch mehrfach wiederholte Absorptionen entfernen möchte. — Ist auch in dem Verhalten des spezifischen Titers bei fortlaufenden Verdünnungen keine exakt lineare Änderung der Wertigkeit ersichtlich, so liegt das in der

natürlichen Schwankungsbreite biologisch-serologischer Reaktionen begründet.

Bei der Verwendung des von Menolasino, Davidsohn u. Lynch angegebenen thermostabilen Wasserbades hat man gegenüber einem Erhitzen im Brutschrank den Vorteil, die gewünschten Inaktivierungs- bzw. Absorptionstemperaturen genauestens einstellen und einhalten zu können.

Um eine Anzahl möglichst sicherer Vergleichswerte über den Effekt einer Temperaturvorbehandlung der Immunseren zu zeigen, sind die Untersuchungsergebnisse des Serums II dargestellt (Tab. 2 und 3); sie enthalten die Resultate verschiedener Temperatureinwirkungen in mehreren Verdünnungs- und Absorptionsstufen bei der Prüfung des spezifischen Anti-N-Titers. Es zeigt sich, daß mit der Temperatureinwirkung von 70° C über 60 min vor der Absorption mit Menschenblutkörperchen keine Vorteile in der Ausbeute der Seren verbunden sind, so daß etwa eine größere Wertigkeit der Seren — ein breiteres spezifisches Wirkungsfeld über eine größere Anzahl von Verdünnungsstufen — zu erreichen wäre. Nach dem Erhitzen auf 70° C hat sich eine Stufenverschiebung der spezifischen Wirksamkeit der Seren eingestellt, die aus einer Herabsetzung des spezifischen wie auch des unspezifischen Titers um durchschnittlich eine Verdünnungsstufe zu erkennen ist. Dieser Verschiebung kann eine günstige Bedeutung insofern zuerkannt werden, als durch sie eine gewisse Einsparung von Absorptionsblut erzielt wird, das etwa für die Absorption des mitgebildeten Anti-M-Titers bei Anti-N-Seren um eine Verdünnungsstufe benötigt wird. Es ist damit nun auch ein kleiner Arbeits- und Zeitgewinn erreicht, eventuell eine Nachabsorption des Serums eingespart.

Die Abb. 1 zeigt den aus der Stufenverschiebung der Serumwertigkeit resultierenden Effekt einer Hitzeeinwirkung von 70° C über 60 min am Beispiel des Serums II.

Bei allen Seren fiel auf, daß das nicht hitzebehandelte Serum nach Zugabe des Absorptionsblutes die schnellste Sedimentierung der Blutkörperchen, und zwar in Form relativ grober Agglutination, aufweist. Das Absorptionsblut sedimentiert in einem auf 56° C erhitzten Serum etwa mit halber Geschwindigkeit, während die Beschaffenheit der Agglutination ungefähr der in den bei Zimmertemperatur belassenen Seren gleicht. Die Sedimentierung des Absorptionsblutes in einem auf 70° C erhitzt gewesenen Serum ist verhältnismäßig gering. Sie geht wesentlich langsamer vor sich, und schon bei der ersten Absorption zeigt sich eine ausgesprochen feine Agglutination der Erythrocyten. Mit diesem Effekt ist sicherlich auch eine größere Wirksamkeit der einzelnen Absorptionen erzielt.

Es konnte beobachtet werden, daß die Absorptionserythrocyten in den Absorptionsgemischen bei der Zentrifugierung, vor allem in mehrfach absorbierten Seren, weniger leicht hämolytisch wurden, wenn die Seren zuvor bei 70° C gehalten worden waren.

Es ist im allgemeinen günstig, zunächst eine Absorption mit relativ großer Menge von Blutkörperchen (Verhältnis des unverdünnten Serums

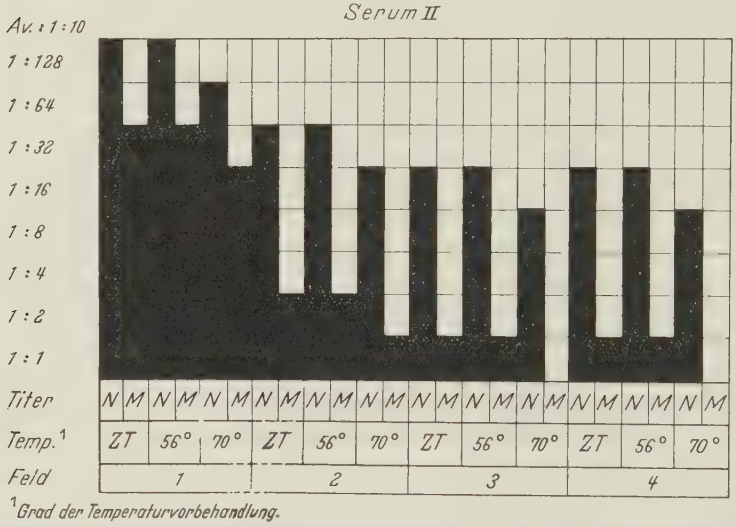


Abb. 1. Die schwarzen Felder stellen den jeweils Anti-N bzw. Anti-M-Agglutinin-Titer dar. Der Titer über Feld *1* = ohne Absorption; der Titer über Feld *2* = nach 2 Absorptionen; der Titer über Feld *3* = nach 3 Absorptionen; der Titer über Feld *4* = nach Absorption bei + 5°C

zur Absorptionsblutmenge = 1 : 6/8) etwa über eine Zeit von 15—20 min vorzunehmen und dann gegebenenfalls Nachabsorptionen mit einer kleineren Verhältniszahl (1 : 1/2) über jeweils eine ganze Stunde anzuschließen. Auf diese Weise lassen sich Arbeit und Zeit sparen, die bei mehrmaligen Absorptionen mit geringeren Blutmengen sehr belastend wirken. Ermittlungsversuche über eine konstante Korrelation zwischen Absorptionsdauer und optimaler Absorptionsblutmenge zeigten, daß es falsch ist, ganz starre Forderungen aufzustellen (ELBEL). Die Individualität des Serums und des Absorptionsblutes verlangt immer wieder eine Anpassung der Maßnahmen in den Absorptionsbedingungen. Gibt man den bei + 5° C im Eisschrank zu absorbierenden Rohseren (Tab. 2 und 3) eine verhältnismäßig große Absorptionsblutmenge (etwa 1 : 6/8) bei, so kann man das Absorptionsgemisch bei stündlichem Aufschütteln 5—6 Std stehen lassen. Die Notwendigkeit von Nachabsorptionen verringert sich bei diesem Verfahren; die mögliche Einsparung von Absorptionsblut ist unbedeutend.

Bewertung der Methode

Die Untersuchungen bestätigen die Angabe von Menolasino, Davidsohn u. Lynch, daß bei der Erhitzung der Immunseren auf 70° C über 1 Std keine Eiweißkoagulation (auch nicht in niedrigen Verdünnungen) auftritt. Unsere Ergebnisse sprechen nicht dafür, daß die Hitzeanwendung eine elektive Wirkung im Sinne einer ausschließlichen Zerstörung der Anti-A-, Anti-B- und Anti-O-Agglutinine hat.

Da Menolasino, Davidsohn u. Lynch ihre Kontrollen vor und nach dem Erhitzen unter Benutzung von A-, B- und O-Zellen ausführten, die offensichtlich auch noch die Receptoren M und N enthielten, sie andererseits auch nicht ein komplexes Anti-H ausschließen konnten, ist es ihnen nicht gestattet, bei der Hitzewirkung auf eine streng elektive Elimination zu schließen.

Wir fanden, daß bei der Erhitzung auf 70° C sowohl der Anti-M- als auch der Anti-N-Titer um etwa eine Stufe sinkt. Dieser Titerverlust wurde auch an Seren beobachtet, die bei vorheriger Kontrolle kein anderes definiertes Agglutinin als Anti-M- und Anti-N aufwiesen.

Wir halten es für eine unbegründete Sorge, die Bedeutung eines möglichen Anti-A-Titers [Dahr (2); Hara; Laubenheimer; Mai; Olbrich; Rasch; Schwarzmann; Thomsen] im Kaninchenserum allzu hoch einzuschätzen (von uns beobachtete Titerhöhen erreichten 1 : 4 bis maximal 1 : 32). Die vorkommenden Titer fallen bei der Verwendung hochwertiger Immunseren nicht ins Gewicht, da sie in den hohen Gebrauchsverdünnungen — sollten sie nach der üblichen Absorption mit A-Blutzellen in vermindertem Maße überhaupt noch vorliegen — keine Wirksamkeit mehr besitzen. Wir sehen in der Absorption mit A-Blutzellen eine ausreichende Sicherung gegen ein Verbleiben von Anti-A-Resten in den Seren.

Eine Beeinträchtigung der Serumwirksamkeit oder -haltbarkeit durch das Hitzeverfahren konnten wir nicht erkennen. Die Methode hat sich — einige technische Einzelvorzüge ausgenommen — gegenüber der Inaktivierungsmethode bei 56° C nicht überlegen gezeigt. Die Vorteile sind in einer mäßigen Zeit-, Arbeits- und allenfalls noch in einer geringen Ersparnis von Absorptionserythrocyten zu sehen (Senkung des spezifischen und heterologen Titers um etwa eine Stufe). Die durch sie bewirkte Herabsetzung der Hämolysegefahr der Absorptionsgemische während mehrmaligen Absorbierens und Zentrifugierens ist zu begrüßen. Eine höhere Ausbeute der Seren nach Hitzeanwendung war nicht zu bestätigen: wir fanden weder eine bessere Verwendungsfähigkeit von mittel- und minderwertigen Seren noch einen günstigeren Absorptionseffekt im Sinne einer Erhöhung der Serumwirksamkeit über eine größere Anzahl von Verdünnungsstufen.

Berücksichtigt man diese technischen Vorzüge des Verfahrens, so kann man seine Anwendung durchaus empfehlen. Es bleibt allerdings

immer der Erfahrung des Serologen überlassen, aus der exakten Kenntnis seiner Seren die angemessenen Maßnahmen zur absorptiven Entfernung unerwünschter Agglutinine zu treffen. Diese richten sich nach der Individualität eines jeden Immunserums wie nach der mit ihr unabdingbar verbundenen Schwankungsbreite aller biologisch-serologischen Reaktionen überhaupt.

Zusammenfassung

Der Vorschlag von Menolasino, Davidsohn u. Lynch, Anti-M- und Anti-N-Rohseren von Kaninchen einer Hitzeeinwirkung von 70° C über 60 min zu unterziehen, wird auf seine praktische Verwendbarkeit und Rentabilität geprüft.

Das Verfahren führt nicht zur Eiweißkoagulation der Seren;

hat eine beschleunigende Wirkung auf die Blutkörperchen-Absorption der Immunseren;

vermindert die Hämolysegefährdung der Absorptions-Erythrocyten während mehrmaligen Absorbierens und Zentrifugierens;

hat sich der Inaktivierungsmethode bei 56° C in bezug auf den Absorptionaseffekt nicht überlegen gezeigt. Auf beiden Wegen wird ein gleicher Reinheitsgrad der Immunseren erreicht;

hat eine Stufenverschiebung des spezifischen Bereiches der Seren nach sich gezogen, die aus einer Verminderung des spezifischen und heterologen Titers um durchschnittlich eine Verdünnungsstufe resultiert;

bewirkt keine Beeinträchtigung der Serumwirksamkeit;

führt zu einem mäßigen Arbeits- und Zeitgewinn und zu einer geringen Absorptionsbluteinsparung, entsprechend der Nachabsorption eines Serums von einer unspezifischen Titerstufe;

ermöglicht keine bessere Verwendbarkeit mittel- und minderwertiger Seren für diagnostische Zwecke.

Die Anwendung des Verfahrens kann empfohlen werden.

Literatur

Andresen, P. H.: The Human Blood groups. Springfield 1952.

Arai, K.: Beiträge zur Herstellung des Anti-M- und Anti-N-Serums. Jap. J. med. Sci. Trans. VII. Soc. Med. **2**, 26 (1938). Zit. nach Mayser; ref. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **31**, 416 (1939).

Beyer, H. G., and A. L. Reagh: The Further Differentiation of Flagellar and Somatic Agglutinins. J. med. Res. **12**, 313 (1904).

Blaurock, G.: Über die agglutinablen Eigenschaften M und N der roten Blutkörperchen. Münch. med. Wschr. **2**, 1552 (1932).

Crome, W.: Über die Untersuchungstechnik der Blutgruppeneigenschaften M und N und Mitteilung weiterer Untersuchungsergebnisse. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **21**, 435 (1933).

Dahr, P.: (1) Zur Serologie der agglutinablen Blutkörperchenmerkmale M und N. Z. Immun.-Forsch. **105**, 383 (1945). — (2) Technik der Blutgruppen- und Blutfaktorenbestimmung, 6. Aufl. Stuttgart: Thieme 1953.

Davidsohn, J., and I. Rosenfield: The Preparation of Anti-M and Anti-N Testing Fluids. Amer. J. clin. Path. **9**, 397 (1939).

Elbel, H.: Zur Technik der Untersuchung auf die Bluteigenschaften M und N. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **24**, 242 (1935).

Fischer, W.: Über Blutgruppeneigenschaften beim Kaninchen. Z. Immun.-Forsch. **86**, 97 (1935).

Hara, K.: Über den Antagonismus zwischen Gruppenmerkmalen und gruppenspezifischen Antikörpern im Kaninchenserum. Z. Immun.-Forsch. **67**, 125 (1930).

Hartwich, W.: Über den Einfluß des Höhenaufenthaltes auf natürliche und Immunhaemagglutinine des Kaninchens. Diss. Bonn, Institut f. Flugmedizin (1957).

Jones, F. S.: The Effect of Heating Antibodies. J. exp. Med. **46**, 291 (1927).

Kindler, M.: Untersuchungen über die Serologie des Blutgruppen-Merkmals M. Z. Immun-Forsch. **109**, 66 (1951/52).

Krah, E.: (1) Untersuchungen über den Nachweis der Blutfaktoren M und N durch die Komplementbindungsreaktion. Z. Immun.-Forsch. **106**, 534 (1949). — (2) Das Verhalten der Anti-M-Rohseren bei der Absorption mit menschlichen Organzellen. Z. Immun-Forsch. **110**, 52 (1953).

Krah, E., u. W. Fischer: Eine vererbbare Gruppeneigenschaft beim Kaninchen. Z. Immun.-Forsch. **100**, 98 (1941).

Künkele, F.: Volumenapparatur zur Herstellung besonders starker Anti-N-Seren. Münch. med. Wschr. **37**, 1520 (1936).

Landsteiner, K., and Ph. Levine: (1) A new Agglutinable Factor Differentiating Individual Human Bloods. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **24**, 60 (1926/27). — (2) Further Observations on individual differences of Human Blood. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **24**, 941 (1926/27). — (3) On individual differences in human blood. J. exp. Med. **47**, 757 (1928).

Laubenheimer, K.: Über die Eigenschaften M und N der roten Blutkörperchen des Menschen, ihren serologischen Nachweis und ihre gerichtlich-medizinische Bedeutung. Med. Klin. **1**, 6, 9 (1933).

Levine, P., J. Celano, St. Lange and V. Berliner: On the Anti-M in Horse-Sera. Vox Sang. (Basel) **2**, 433 (1957).

Mai, I.: Über den Nachweis von Gruppenmerkmalen in den Organen und ihre Bedeutung für die serologische Reaktionsfähigkeit des Organismus. Z. Immun.-Forsch. **66**, 213 (1930).

Menolasino, N. J., and I. Davidsohn: A Simplified Method for Preparation of Antihuman Globuline (Coombs) Serum. Amer. J. clin. Path. **24**, (1954); zit. nach Menolasino, N. J. u. a.: J. Lab. clin. Med. **44**, 495 (1954).

Menolasino, N. J., I. Davidsohn and D. E. Lynch: A Simplified Method for the Preparation of Anti-M and Anti-N Typing-Sera. J. Lab. clin. Med. **44**, 495 (1954).

Olbrich, S.: (1) Über die Herstellung und Absorption von Anti-M- und Anti-N-Immunseren unter besonderer Berücksichtigung der Absorptionstechnik zur Erzielung optimaler Abgüsse. Z. Immun.-Forsch. **88**, 63 (1936). — (2) Über die Gewinnung hochwertiger Anti-N-Immunseren durch kombinierte passive und aktive Immunisierung von Kaninchen. Z. Immun.-Forsch. **94**, 247 (1938).

Pietrusky, F.: Über die praktische Brauchbarkeit der Blutfaktoren M und N für den Vaterschaftsausschluß — zugleich ein Beitrag zum Nachweis des defekten N-Rezeptors. Münch. med. Wschr. **28**, 1123 (1936).

Püschel, J.: Die Landsteiner-Levinesche Blutfaktoren M und N in der Praxis. Z. Immun.-Forsch. **81**, 445 (1933).

Rasch, L. H.: Lehrbuch der Blutgruppenkunde. Berlin: De Gruyter 1954.

Rowe, B., and M. Fulton: Heat Inactivation of O Antibody in Salmonella Sera. Bact. Proc. **46**, (1952).

Schiff, F.: (1) Die gerichtliche medizinische Bedeutung der serologischen Eigenschaften M und N von Landsteiner und Levine. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **18**, 41 (1932). — (2) Die forensische Bedeutung der Faktoren M und N und anderer neuerer serologischer Typenmerkmale. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **21**, 404 (1933). — (3) Technik der Blutgruppenuntersuchung. Berlin: Springer 1932.

Schwarzmann, L. A.: Die gruppenspezifische Differenzierung der Tierorgane (Kaninchen). Z. Immun.-Forsch. **87**, 525 (1936).

Steffan, P.: Handbuch der Blutgruppenmerkmale. München: J. F. Lehmann 1932.

Stichnoth, E., H. Hunger u. A. Vogt: Untersuchungen über gemeinsame Partialantigene an Mensch, Pferd und Schwein im Hinblick auf M-N-Faktoren. Z. Immun.-Forsch. **118**, 482 (1959).

Thomsen, O.: Über die Zusammensetzung der Blutgruppen-A-Eigenschaften beim Menschen (A- und AB-Gruppe) und Kaninchen. Z. Immun.-Forsch. **87**, 335 (1936).

Wildführ, G.: Über die Stufenwertigkeit (Titerhöhe) brauchbarer Anti-M- und Anti-N-Testseren. Z. Immun.-Forsch. **105**, 111 (1945).

Dr. Ulrich Heifer,
Institut für gerichtliche Medizin der Universität, Bonn, Wilhelmplatz 7

Zeitschrift f. Hygiene 148, 39—44 (1961)

Aus dem Bakteriologischen Laboratorium der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten zu Hamburg (Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Schuchardt)

Neisseria flava (Bergey et al., 1923): Art oder Varietät?

Von

U. Berger und H. Brunhoeber

(Eingegangen am 24. Juli 1961)

Nach Bergey's Manual (1957) läßt sich die Gruppe der pigmentbildenden Neisserien in fünf Arten aufteilen (*N. flavescens, N. caviae, N. subflava, N. flava, N. perflava*), von denen jedoch nur die beiden ersten allgemeine Anerkennung gefunden haben. Die Klassifizierung der drei übrigen Arten wurde offenbar von den Bearbeitern der Familie *Neisseriaceae* selbst als unsicher empfunden (Warner, Faber u. Pelczar 1952; Murray u. Branham 1953). So vertreten auch Wilson u. Miles (1955) den Standpunkt, daß die Unterscheidung von *N. perflava, N. flava* und *N. subflava* kaum gerechtfertigt sei, da sie sich nicht mit ausreichender Sicherheit trennen lassen, und schlugen vor, sie in *einer* Art, als *N. pharyngis* bezeichnet, zusammenzufassen. Wir selbst hatten uns dieser Auffassung früher angeschlossen (Berger 1953; Berger u. Wezel 1960). Nach neueren Erfahrungen sind wir jedoch zu der Überzeugung gelangt, daß *N. perflava* zwar eine eigene Art darstellt, *N. flava* und *N. subflava* dagegen in ihren Eigenschaften so unbedeutend voneinander abweichen, daß sie wahrscheinlich nicht als zwei getrennte Arten angesehen werden können (Berger 1961a; Berger u. Wulf 1961).

Um den Grad der Verwandtschaft dieser beiden Typen zu ermitteln, wurden je fünf Stämme von *N. subflava* und *N. flava* auf eine Reihe von Eigenschaften vergleichend untersucht.

Methoden

Stämme. Es wurden je fünf Stämme von *N. subflava* (115, 158, 163, 166, 208) und *N. flava* (118, 186, 212, B, X4) verwendet. Sie waren mit Ausnahme von *N. flava* B, die wir Dr. M. Pittman, Bethesda (Md), verdanken, vor einigen Monaten in unserem Laboratorium isoliert, die Artdiagnosen auf Grund der Zuckervergärungen auf der Lingelsheim-Platte gestellt worden.

Biochemische Leistungen. Außer den Zuckervergärungen (Glucose, Maltose, Fructose, Saccharose) wurde auf Polysaccharid- und Schwefelwasserstoffbildung, Tributyrinspaltung sowie Nitrat- und Nitritreduktion untersucht. Von den Pigmenten wurden Methanolextrakte hergestellt (Berger 1961c). — In 1%iger Maltosebouillon (5% Asciteszusatz) wurde durch tägliche potentiometrische Messungen (p_H-Meter „Knick") der Verlauf der p_H-Kurven festgestellt. Hierbei wurden zum Vergleich je drei Stämme von *N. perflava* und *N. sicca* mituntersucht.

Die *Empfindlichkeit gegen Antibiotica und Chemotherapeutica* wurde beim Penicillin im Röhrchentest, bei den anderen Substanzen (Streptomycin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Erythromycin, Oleandomycin, Novobiocin, Spiramycin, Polymyxin B, Kanamycin, Neomycin, Bacitracin, Sulfonamid, Nitrofurazon) im Blättchentest ermittelt.

Serologie. — *Präcipitation.* Im Röhrchentest wurden autoklavierte Antigene aller zehn Stämme auf ihre Reaktion mit je zwei *N. flava-* und *N. subflava*-Antiseren (118, 186 bzw. 115, 163) untersucht. — Die *Agglutination* wurde sowohl im Röhrchentest als auch auf dem Objektträger geprüft. — *Agglutininabsorption.* Das 1 : 5 verdünnte *N. flava*-Antiserum 186 wurde mit allen *N. subflava*-Stämmen, das *N. subflava*-Antiserum 163 in gleicher Weise mit allen *N. flava*-Stämmen absorbiert; danach wurden die Agglutinationsproben wiederholt.

Ergebnisse

Koloniemorphologisch waren zwischen *N. flava-* und *N. subflava*-Stämmen keine Unterschiede zu erkennen: die Kolonien sind ziemlich klein, rund, gelblich, zunächst glatt; nach zwei- bis dreitägiger Bebrütung bildet sich häufig ein zentraler Knopf und feine radiäre Runzelung heraus. Die Blutplatte wird in der Umgebung der Kolonien grünlich verfärbt; Hämolyse wurde nicht beobachtet.

In *Serumbouillon* wachsen die meisten Stämme mit Randbildung, geringer diffuser Trübung und schleimigem oder bröckligem Bodensatz. Zwei Stämme von *N. subflava* (158, 208) ließen die Bouillon jedoch klar.

In den *Zuckervergärungen* verhielten sich die Stämme typisch: aus Maltose wurde von allen, aus Fructose von allen *N. flava*-Stämmen Säure gebildet; Glucose wurde nur von einem Teil der Stämme (*N. flava* 118; *N. subflava* 166, 208) angegriffen. Aus Saccharose wurde weder Säure noch Polysaccharid gebildet.

Die *p_H-Kurven in Maltosebouillon* verliefen bei *N. flava* und *N. subflava* flach, der Endwert war erst nach siebentägiger Bebrütung erreicht; er betrug bei *N. flava* 5,63, bei *N. subflava* 5,25 (Mittelwerte). Die p_H-Kurven von *N. perflava* und *N. sicca* fielen dagegen steil ab; der Endwert lag tiefer (5,03 bzw. 5,04 im Mittel) und war schon nach 3—4 Tagen erreicht.

Schwefelwasserstoff wurde von allen Stämmen in Pankreatinbouillon, niemals dagegen in Bacto Heart Infusion Broth (Difco) gebildet. *Tributyrin* wurde von keinem der Stämme gespalten. *Nitrat* wurde nicht reduziert, *Nitrit* denitrifiziert; ein abweichendes Verhalten zeigte nur *N. subflava* B (vgl. Berger 1961 d).

Die *Pigmentextrakte* ließen weder hinsichtlich ihrer Farbtönung noch ihrer Farbintensität artspezifische Unterschiede erkennen.

Die Ergebnisse der *Antibioticatests* sind auf Tab. 1 wiedergegeben. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede im Verhalten der beiden Arten. Im Röhrentest betrugen die minimalen Hemmungskonzentrationen des Penicillin bei *N. flava* 0,5—2,5 γ/ml, bei *N. subflava* 1,0—2,5 γ/ml.

Die Ergebnisse der *Präcipitationsreaktionen* zeigt Tab. 2. Daraus geht hervor, daß — abgesehen von den spezifischen Reaktionen — die *N. subflava*-Extrakte mit den *N. flava*-Antiseren präzipitierten und vice versa.

Tabelle 1. *Resistenz von je fünf N. subflava-Stämmen und fünf (bzw. vier) N. flava-Stämmen gegen Antibiotica und Chemotherapeutica*

Testsubstanz	Gehalt	N. subflava			N. flava		
		s	*m*	*r*	*s*	*m*	*r*
Penicillin	0,5 E	—	—	5	—	2	2
Streptomycin[1]	10 γ	5	—	—	3	1	—
Tetracyclin[1]	10 γ	5	—	—	4	—	—
Chloramphenicol[1]	10 γ	5	—	—	4	—	—
Kanamycin[1]	10 γ	4	1	—	3	1	—
Erythromycin	1 γ	—	—	5	—	1	4
Oleandomycin	10 γ	—	4	1	—	5	—
Novobiocin	10 γ	—	1	4	—	4	1
Spiramycin	50 γ	—	2	3	—	3	2
Polymyxin B	10 E	—	—	5	—	—	5
Neomycin	10 γ	—	4	1	—	3	2
Bacitracin	2 E	—	—	5	—	—	5
Sulfonamid[1]	50 γ	5	—	—	4	—	—
Nitrofurazon	1 mg	5	—	—	4	1	—

s sensibel, *m* mäßig sensibel, *r* resistent.
Die Ziffern bedeuten die Anzahl der Stämme der betr. Resistenzstufe.
[1] Testblättchen „Bayer"; die übrigen Blättchen wurden selbst hergestellt.

Tabelle 2. *Ergebnisse der Präcipitationsreaktionen (Röhrchentest): je fünf Stämme von N. subflava und N. flava mit je zwei Antiseren gegen diese Arten*

Antigene		Antisera			
		N. subflava		N. flava	
		115	163	118	186
Subflava	115	+	+	—	+
	158	—	+	+	—
	163	+	+	—	+
	166	+	+	—	+
	208	+	+	—	+
Flava	118	+	+	+	+
	186	+	+	—	+
	212	+	+	—	+
	B	+	+	—	+
	X4	+	+	+	+

Tabelle 3. *Ergebnisse der Objektträgeragglutinationen (Stämme und Antisera wie Tab. 2)*

Antigene		Antisera			
		N. subflava		N. flava	
		115	163	118	186
Subflava	115	+	+	—	+
	158	—	—	—	—
	163	+	+	—	+
	166	—	—	—	—
	208	+	+	—	+
Flava	118	serumagglutinabel			
	186	+	+	—	+
	212	—	—	—	(+)
	+B	+	+	—	+
	X4	serumagglutinabel			

Zum gleichen Resultat führten die *Objektträgeragglutinationen* (Tab. 3). Wegen der starken und zugleich schwankenden Kochsalzagglutinabilität

der meisten Stämme, die beim Objektträgertest wesentlich weniger stört, wird auf eine Wiedergabe der Ergebnisse der Röhrchenagglutination hier verzichtet.

Nach der *Agglutininabsorption* läßt sich keine Reaktion irgendeines Stammes in einem der beiden Antiseren erkennen (Tab. 4). Tab. 5 schließlich zeigt zur Bestätigung dieser Befunde die Agglutinationsergebnisse in den unveränderten und den absorbierten Antiseren mit je vier weiteren, ad hoc isolierten Stämmen von *N. flava* und *N. subflava*.

Tabelle 4. *Ergebnisse der Objektträgeragglutinationen in einem mit den 5 N. subflava-Stämmen absorbierten N. flava-Antiserum und in einem mit den 5 N. flava Stämmen absorbierten N. subflava-Antiserum*

Antigene	Absorbierte Antisera	
	N. subflava 163	N. flava 186
Subflava 115	—	—
158	—	—
163	—	—
166	—	—
208	—	—
Flava 118	serumagglutinabel	
186	—	—
212	—	—
B	—	—
X4	serumagglutinabel	

Tabelle 5. *Objektträgeragglutinationen weiterer, frisch isolierter N. flava- und N. subflava-Stämme in spezifischen und absorbierten Antiseren*

Antigene	Antisera			
	N. subflava 163 1 : 5	absorb.	N. flava 186 1 : 5	absorb.
Subflava 4R	+	—	+	—
173	+	—	+	—
182	+	—	—	—
178	+	—	+	—
Flava 7	+	(+)	+	—
34	+	—	+	—
A2(8)	—	—	+	—
193	—	—	+	—

Diskussion

Auf die Frage nach dem Verwandtschaftsgrad der pigmentbildenden saprophytischen *Neisseria*-Arten des Menschen gibt es zur Zeit noch keine befriedigende Antwort. Der augenblickliche Stand der Diskussion wurde eingangs umrissen; danach stehen sich zwei Auffassungen gegenüber: die eine, die drei Arten annimmt (Bergey's Manual), der anderen, die alle drei Typen in *einer* Art zusammenfaßt (Wilson u. Miles).

Nach unseren Erfahrungen wird *N. perflava* mit Recht als eigene Art betrachtet, da sie eine Reihe spezifischer Merkmale aufweist und auch in antigener Hinsicht eine Einheit bildet (Berger u. Wulf). Die Trennung von *N. flava* und *N. subflava* gründet sich dagegen fast ausschließlich auf das Verhalten gegenüber *einem* Zucker, dem Monosaccharid Fructose.

Es wurde an anderer Stelle gezeigt, daß bei den Neisserien nur die Verwertung der Disaccharide (Maltose, Saccharose) konstant ist, während

die Verwertung der Monosaccharide (Glucose, Fructose) eine inkonstante und variable Eigenschaft darstellt (Berger 1961a, b). Mit ähnlicher Begründung wird übrigens die Fructose als diagnostischer Zucker auch von Wilson u. Miles abgelehnt. Es erscheint demnach verständlich, daß Säurebildung aus diesem (oder einem anderen) Monosaccharid allein für die Anerkennung einer eigenen Art (*N. flava*) nicht ausreicht.

Wir haben deshalb versucht, weitere Merkmale zu finden, die eine Trennung von *N. subflava* und *N. flava* rechtfertigen. Zwar ist die biochemische Aktivität der Neisserien, soweit bis heute bekannt, gering, doch konnte im Rahmen der bestehenden Möglichkeiten gezeigt werden, daß weder im Typ des Wachstums noch in den biochemischen Eigenschaften beider Typen irgendwelche signifikanten Unterschiede zu finden sind, wenn man von der Fructoseverwertung absieht.

Das gleichartige Verhalten beider Typen gegenüber den geprüften Antibioticis und Chemotherapeuticis wird man allerdings nicht überbewerten dürfen, da verwandte Arten in der Regel auch ein gleiches Antibiogramm aufweisen.

Die serologischen Untersuchungen hatten ein analoges Ergebnis. Bei der Präcipitation wie bei der Agglutination reagierten die heterologen Stämme in den *N. subflava*-Antiseren bzw. den *N. flava*-Antiseren nicht weniger kräftig als die homologen Stämme. Es ist dabei zu bemerken, daß sich offenbar kaum eine Art der Gattung *Neisseria* serologisch ganz einheitlich verhält; gemeinsame Partialantigene kommen bei verschiedenen Arten vor, wie umgekehrt verschiedene Stämme der gleichen Art nicht immer das gleiche Antigenmosaik aufweisen. So erklärt sich, daß beispielsweise das *N. subflava*-Antiserum 115 nicht mit *N. subflava* 158, wohl aber mit den *N. flava*-Stämmen reagierte, während das *N. flava*-Antiserum 118 zwar mit dem Extrakt von *N. subflava* 158, nicht aber mit drei der fünf *N. flava*-Extrakte präzipitierte.

Wegen dieser unterschiedlichen antigenen Zusammensetzung innerhalb einer Art wurden die Absorptionen mit jeweils fünf Stämmen durchgeführt, um so möglichst alle Partialantigene zu erfassen. Dabei ergab sich, daß sich aus den Antiseren mit *N. subflava*-Zellen auch die Antikörper gegen *N. flava*, mit *N. flava*-Zellen auch die Antikörper gegen *N. subflava* quantitativ eliminieren ließen. Daraus wird man einmal schließen dürfen, daß *N. subflava* und *N. flava* serologisch identisch sind, und zum anderen, daß die antigenen Differenzen, die zwischen den verschiedenen Stämmen bestehen, nicht als artspezifisch angesehen werden können, sondern auf einer ungleichmäßigen Verteilung der Partialantigene beruhen.

Auf dem Boden dieser Ergebnisse schlagen wir nunmehr vor, die beiden zur Diskussion stehenden Typen in der Art *N. subflava* zu vereinigen. Der bisher als *N. flava* bezeichnete Typ wäre dann lediglich als fructosespaltende Varietät dieser Art, also als *N. subflava* var. *flava*, aufzufassen.

Zusammenfassung

Vergleichende Untersuchungen an je fünf Stämmen von *N. subflava* und *N. flava* haben ergeben, daß sich diese Keime nur in einem einzigen, zudem geringwertigen Merkmal, der Fructosevergärung, unterscheiden. Es wird deshalb vorgeschlagen, die beiden Typen in der Art *N. subflava* zusammenzufassen und die fructosespaltende *N. flava* als deren Varietät: *N. subflava* var. *flava* zu klassifizieren.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

Berger, U.: Über hämolysierende Stämme saprophytischer Neisserien. Arch. Hyg. (Berl.) **137**, 499 (1953).

Berger, U.: Zur Verwertung von Monosacchariden durch saprophytische Neisserien. Arch. Hyg. (Berl.) **145**, 190 (1961a).

Berger, U.: Zur Variabilität der Zuckervergärungen durch Neisserien. Arch. Hyg. (Berl.) **145**, 296 (1961b).

Berger, U.: Untersuchungen über die Pigmentbildung durch Neisserien. Z. Hyg. Infekt-Kr., **147**, 461 (1961c).

Berger, U.: Reduktion von Nitrat und Nitrit durch Neisseria. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 45 (1961d).

Berger, U., u. M. Wezel: Zur Frage der Identität hämolysierender saprophytischer Neisserien. Z. Hyg. Infekt-Kr. **146**, 244 (1960).

Berger, U., u. B. Wulf: Untersuchungen an saprophytischen Neisserien. Z. Hyg. Infekt-Kr. **147**, 257 (1961).

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7. Aufl., Baltimore 1957.

Murray, E. G. D., and S. E. Branham: Interim report of sub-committee on the family Neisseriaceae. Atti VI Congr. intern. Microbiol. **1**, 7 (1953).

Warner, G. S., J. E. Faber and M. J. Pelczar: A serological study of certain members of the aerobic nonpathogenic Neisseria group. J. infect. Dis. **90**, 97 (1952).

Wilson, G. S., and A. A. Miles: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 4. Aufl., London 1955.

Privatdozent Dr. med. U. Berger,
Hamburg 20, Martinistr. 52

Zeitschrift f. Hygiene 148, 45—50 (1961)

Aus dem Bakteriologischen Laboratorium der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten zu Hamburg (Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Schuchardt)

Reduktion von Nitrat und Nitrit durch Neisseria

Von
Ulrich Berger*

(Eingegangen am 24. Juli 1961)

Zwar kommt nach den einschlägigen Werken (Topley and Wilson's Principles, 1955; Bergey's Manual, 1957) Reduktion von Nitrat zu Nitrit in der ganzen Familie *Neisseriaceae* nur bei einer einzigen Art, *Veillonella parvula*, vor, doch konnte inzwischen gezeigt werden, daß diese Leistung zumindest auch bei der viel häufigeren *Veillonella alcalescens* regelmäßig nachzuweisen ist (Langford u. Mitarb., 1950; Sims 1960; Berger 1960). Nachdem nun kürzlich eine neue Art der Gattung *Neisseria* beschrieben wurde (*N. ovis* Lindquist 1960), die ebenfalls Nitrat reduziert, und nachdem wir selbst schwache und unregelmäßige Nitratreduktion bei einigen Stämmen von *N. caviae* gefunden hatten, erschien uns eine Überprüfung des Verhaltens aller *Neisseria*-Arten gegenüber Nitrat und Nitrit angezeigt.

Methoden

Stämme. Es wurden insgesamt 52 Stämme aller bisher bekannten Arten untersucht: *N. gonorrhoeae* (2), *N. meningitidis* (4), *N. sicca* (4), *N. perflava* (7), *N. subflava* (6), *N. subflava* var. *flava* (5), *N. animalis* (3), *N. flavescens* (6), *N. catarrhalis* (4), *N. caviae* (8) und *N. ovis* (3).

Nitratreduktion. Die Kulturen wurden nach 5—7tägiger Bebrütung in 0,1%iger Kaliumnitratbouillon (Bacto Heart Infusion Broth „Difco"; bei Gono- und Meningokokken mit 10% Pferdeserum) auf die Anwesenheit von Nitrit mit den Reagentien von Griess-Ilosvay, auf die Abwesenheit von Nitrat nach Reduktion mit Zinkpulver mit den gleichen Reagentien geprüft.

Nitritreduktion. Die Kulturen wurden nach fünftägiger Bebrütung in 0,1%iger Kaliumnitritbouillon (Basis und Serumzusatz wie oben) auf die Anwesenheit von Nitrit wie oben getestet. Die wenigen Stämme, für die sich diese Konzentration als toxisch erwies, wurden in 0,03 oder 0,01%iger Nitritbouillon nachuntersucht.

Adaptive Nitratasebildung wurde bei allen Nitrat nicht oder nicht regelmäßig reduzierenden Stämmen (außer *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis*) durch drei Passagen über 0,5%igen Nitratagar und anschließende Überimpfung in 0,1%ige Nitratbouillon geprüft; nach fünftägiger Bebrütung wiederum Reaktionen auf Nitrit und Nitrat.

Gasbildung. In Gärröhrchen nach Einhorn, die 15 ml Nitrat-, Nitrit- oder Nährbouillon enthielten, wurden die Stämme 4 Tage lang bebrütet und danach die

* Herrn Prof. Dr. Dr. K. Schuchardt zum 60. Geburtstag gewidmet.

Menge des gebildeten Gases registriert. Zugleich wurde auf Wachstum im aufsteigenden Schenkel des Röhrchens, also unter mikroaerophilen Verhältnissen, geachtet und in der Nitritbouillon die Reaktion nach Griess-Ilosvay, in der Nitratbouillon die gleiche Reaktion vor und nach Reduktion mit Zinkpulver wiederholt.

Zur *Analyse des Gases* wurde ein kräftig gasbildender Stamm (*N. animalis* 10) in 280 ml Nitritbouillon, die einen Rundkolben mit aufgesetztem gebogenem Vacuumvorstoß vollständig ausfüllte, geimpft. Nach zweitägiger Bebrütung waren etwa 60 ml Gas entstanden, das mit dem Atlas-Massenspektrometer, Typ CH 3, auf seine Zusammensetzung untersucht wurde[1].

Ammoniakbildung wurde bei den nitratreduzierenden Stämmen in Nitratbouillon, bei den nitritreduzierenden Stämmen in Nitritbouillon, bei allen Stämmen außerdem in Nährbouillon nach fünftägiger Bebrütung mit dem Reagens von Hansen geprüft.

Ergebnisse

Die einzige Art, die *Nitrat* regelmäßig zu Nitrit reduzierte, war *N. ovis*; das gleiche Verhalten zeigte nur noch ein Stamm von *N. caviae* (R). Schwache und variable Nitratreduktion, wobei sich Nitrit jedoch oft nicht nachweisen ließ, fanden wir bei allen übrigen Stämmen von *N. caviae*, bei *N. flavescens* und *N. animalis* sowie bei einigen Stämmen von *N. catarrhalis*, *N. subflava* var. *flava* und *N. perflava*. Regelmäßig wurde Nitrat auch von *N. subflava* B, *N. catarrhalis* B und *N. caviae* GP reduziert, doch zumeist ohne Anhäufung nachweisbarer Nitritmengen.

Adaptive Bildung oder Verstärkung einer schwach aktiven Nitratase konnte in keinem Falle hervorgerufen werden.

Nitrit wurde, mit Ausnahme von *N. gonorrhoeae* und den kräftig nitratreduzierenden Stämmen (*N. ovis*, *N. caviae* R), regelmäßig reduziert, und zwar teils mit, teils ohne Gasproduktion. *Gas* bildeten *N. sicca*, *N. perflava*, *N. subflava* (außer Stamm B), *N. subflava* var. *flava*, *N. animalis*, *N. flavescens* sowie ein Teil der Stämme von *N. meningitidis* und *N. catarrhalis*. Die Menge des unter den angegebenen Bedingungen entstandenen Gases betrug, im Durchschnitt der positiven Stämme, bei *N. meningitidis* 0,15 ml, bei *N. sicca* 1,25 ml, bei allen übrigen saccharolytischen Arten 0,95 ml, bei *N. flavescens* 0,65 ml und bei *N. catarrhalis* 0,6 ml. Nur die kräftig gasbildenden Stämme ($> 1{,}0$ ml) zeigten mit bloßem Auge erkennbares Wachstum auch im aufsteigenden Schenkel des Gärröhrchens. — Ohne Gasbildung wurde Nitrit von *N. caviae* (außer Stamm R), zwei Stämmen von *N. meningitidis* (6,17) sowie je einem Stamm von *N. subflava* (B) und *N. catarrhalis* (B) reduziert (Tab. 1).

Das *Gas* bestand zum überwiegenden Teil aus Stickstoff und enthielt geringe Mengen Kohlendioxyd. Stickoxydul (N_2O) ließ sich nicht darin nachweisen.

[1] Herr Diplomchemiker W. Müller-Duysing, Physikalisches Institut der Universität (Direktor: Prof. Dr. H. Neuert), hatte die Freundlichkeit, diese Messungen für uns durchzuführen. Beide Herren seien meines aufrichtigen Dankes versichert.

Ammoniak wurde von allen Stämmen in Spuren gebildet, und zwar in Nährbouillon ebenso wie in Nitrat- bzw. Nitritbouillon.

Tabelle 1. *Nitrat- und Nitritreduktion durch Neisseria*

Art	Stämme	Nitratreduktion		Nitritreduktion	
		direkt	indirekt	mit Gas	ohne Gas
N. gonorrhoeae	134, 135	—	—	—	—
N. meningitidis	83, 93	—	—	(+)	
	6, 17	—	—		(+)
N. sicca	E, B, CN, 11	—	—	+++	
N. perflava	A 1, A 2, B, P 3,				
	191, 209	—	—	+/+++	
	199	(v)	(v)	+++	
N. subflava	115, 158, 163,				
	166, 208	—	—	++/+++	
	B	(v)	+		+
N. subflava	B, 118	—	—	++/+++	
var. flava	186, 212, X 4	(v)	(v)	++/+++	
N. animalis	10, 11, 12	(v)	(v)	+/+++	
N. flavescens	B, 1, 2, 3, 4, 5	(v)	(v)	+/+++	
N. catarrhalis	8, 69	—	—	+	
	E	(v)	(v)	+++	
	B	(v)	+		(+)
N. caviae	1, 4, 5, 6, 32, 42	(v)	(v)		+
	GP	(v)	+		+
	R	+++		—	—
N. ovis	37, 917, 623	+++		—	—

Anmerkung: Nitratreduktion direkt = Nitritnachweis (Griess-Ilosvay); Nitratreduktion indirekt = Nitritnachweis nach Reduktion; (v) = schwach und variabel positiv.

Diskussion

Der *Nitratreduktion* durch *Neisseria* ist bisher wenig Aufmerksamkeit gewidmet worden. Sieht man von der erst kürzlich von Lindquist (1960) beschriebenen *N. ovis* ab, so wurden Stämme mit dieser Fähigkeit offenbar nur von Morris (1954) gefunden; neun seiner 30 Typen reduzierten Nitrat zu Nitrit oder über Nitrit hinaus. So werden die Neisserien in Bergey's Manual (1957) auch als indifferent gegen Nitrat beschrieben.

Über die *Reduktion von Nitrit* aber ist offenbar gar nichts bekannt. Es ist daher vielleicht besonders interessant, daß die meisten Arten von *Neisseria* in der Lage sind, Nitrit bis zu elementarem Stickstoff zu reduzieren, also zu denitrifizieren.

Denitrifikation von Nitrat bzw. Nitrit ist bisher nur bei einer kleineren Zahl streng aerober Arten der Gattungen *Pseudomonas, Micrococcus, Bacillus* und *Spirillum* gefunden worden (Clifton). Die Neisserien

sind bekanntlich ebenfalls strenge Aerobier, mit Ausnahme von *N. gonorrhoeae*, die auch nicht denitrifiziert, und in gewissem Maße wohl auch von *N. meningitidis*, deren Fähigkeit zu dieser Leistung an der Grenze der Nachweisbarkeit liegt.

Das aus Nitrit gebildete *Gas* bestand, wie zu erwarten war, fast ausschließlich aus *Stickstoff*; die geringe Menge *Kohlendioxyd*, die ebenfalls darin nachgewiesen wurde, wäre als Endprodukt des Stoffwechsels organischer Substrate anzusehen. Ob das *Stickoxydul* (N_2O), wie früher angenommen, eine obligate Zwischenstufe der Denitrifikation darstellt, ist durch die Untersuchungen von Sacks u. Barker (1952) sowie Allen u. van Niel (1952) fraglich geworden; es erscheint jedoch möglich, daß diese Verbindung durch eine Seitenreaktion gebildet werden kann. Unter den von uns hergestellten Bedingungen war N_2O jedenfalls nicht entstanden, wenngleich einschränkend auf die hohe Wasserlöslichkeit dieses Gases hingewiesen werden muß; mit Sicherheit kann also nur gesagt werden, daß die Menge des eventuell gebildeten N_2O die für die Sättigung der Nährlösung erforderliche Konzentration nicht überstieg.

Auch *Ammoniak* entstand bei der Nitritreduktion offenbar nicht; es fand sich zwar in Spuren in der Nitritbouillon, ebenso aber auch in der nitritfreien Kontrolle.

Reduktion von Nitrat wurde als Artmerkmal nur bei *N. ovis* in Bestätigung der Angaben von Lindquist gefunden, darüber hinaus noch bei einem Stamm von *N. caviae* (R). Sehr schwache und variable Nitritbildung konnte aber auch — zum Teil allerdings erst bei achtmaliger Wiederholung der Versuche — bei nicht wenigen Stämmen fast aller anderen Arten beobachtet werden. Obwohl die Nitratase nach Conn ein adaptives Enzym darstellt, gelang es nicht, die schwach reduzierenden Stämme durch mehrere Passagen über Nitratagar zu einer verstärkten Nitratreduktion anzuregen. Daß der nur gelegentliche und schwache Nitritnachweis nicht mit einem schnellen weiteren Abbau über Nitrit hinaus erklärt werden kann, ergibt sich aus den Resultaten des Nitratnachweises: ein wesentlicher Schwund von Nitrat wurde bei diesen Stämmen ebenfalls nicht beobachtet. Auch hätte bei kräftigerer Reduktion des Nitrat über Nitrit hinaus Gas entstehen müssen, das von den gleichen Stämmen bei Angebot von Nitrit gebildet wurde; Gas aber erschien in der Nitratbouillon niemals.

Deutliche und regelmäßige Reduktion über Nitrit hinaus bewirkten nur vereinzelte Stämme verschiedener Arten (*N. subflava* B, *N. catarrhalis* B, *N. caviae* GP).

Nach ihrem Nitrat- und Nitritverhalten ließen sich also folgende *Typen* aufstellen:

1. Weder Nitrat noch Nitrit reduziert;

2. Nitrat nicht (oder sehr schwach und variabel) reduziert, Nitrit denitrifiziert;
3. Nitrat nicht (oder sehr schwach und variabel) reduziert, Nitrit ohne Gasbildung reduziert;
4. Nitrat über Nitrit hinaus reduziert, Nitrit ohne Gasbildung reduziert;
5. Nitrat zu Nitrit reduziert, Nitrit nicht reduziert.

Abschließend sei noch das Regelverhalten der verschiedenen Arten gegenüber Nitrat und Nitrit angegeben (Tab. 2).

N. gonorrhoeae: weder Nitrat noch Nitrit reduziert.

N. meningitidis: Nitrat nicht reduziert, Nitrit schwach denitrifiziert.

N. sicca, N. perflava, N. subflava, N. subflava var. *flava, N. animalis, N. flavescens:* Nitrat nicht (oder sehr schwach und variabel) reduziert, Nitrit denitrifiziert.

N. catarrhalis: a) wie *N. flavescens*; b) Nitrat über Nitrit hinaus reduziert, Nitrit ohne Gasbildung reduziert.

N. caviae: a) ähnlich *N. catarrhalis* (Gruppe b); b) wie *N. ovis.*

N. ovis: Nitrat kräftig zu Nitrit reduziert, Nitrit nicht reduziert.

Tabelle 2. *Regelverhalten der Neisserien gegenüber Nitrat und Nitrit*

Art		Reduktion von Nitrat		Reduktion von Nitrit
		zu Nitrit	über Nitrit hinaus	
N. gonorrhoeae		—	—	—
N. meningitidis		—	—	+
N. sicca		—	—	+
N. perflava		—	—	+
N. subflava		—	—	+
N. subflava var. flava			(v)	+
N. animalis			(v)	+
N. flavescens			(v)	+
N. catarrhalis	a		(v)	+
	b		+	(+)
N. caviae	a		(v)	(+)
	b	+		—
N. ovis		+		—

Anmerkung: Nitratreduktion (v) = schwach und variabel; Nitritreduktion + = mit Gasbildung, (+) = ohne Gasbildung.

Aus der Tab. 2 geht außer dem Regelverhalten der Arten hervor, daß 1. mit Zunahme der Fähigkeit zur Nitratreduktion die Fähigkeit zur Nitritreduktion abnimmt und vice versa; 2. die Fähigkeit zur Nitritreduktion gleichsinnig der Fähigkeit zur Zuckerspaltung abnimmt (auf Tab. 2 von oben nach unten); 3. *N. catarrhalis* und *N. caviae* im Hinblick auf die hier geprüften Merkmale keine einheitlichen Gruppen darstellen.

Für die beiden mäßig wachsenden pathogenen Arten (*N. gonorrhoeae, N. meningitidis*) treffen die beiden ersten Beobachtungen allerdings nicht in vollem Umfang zu.

Reduktion von Nitrat und Nitrit stellen demnach so charakteristische Merkmale dar, daß sie in die Gattungs- und Artbeschreibungen der Neisserien aufgenommen werden sollten.

Zusammenfassung

52 Stämme aller bekannten Arten von *Neisseria* wurden auf ihre Fähigkeit zur Nitrat- und Nitritreduktion sowie zur Ammoniakbildung untersucht.

Es ergab sich, daß — mit Ausnahme der mikroaerophilen *N. gonorrhoeae* — alle zuckerverwertenden Arten Nitrit denitrifizieren, ohne Nitrat in nennenswertem Maße anzugreifen. Ebenso verhalten sich die meisten Stämme von *N. catarrhalis*.

N. caviae reduziert Nitrit ohne Gasbildung. Die kräftig nitratreduzierende *N. ovis* ist dagegen indifferent gegen Nitrit.

N. gonorrhoeae reduziert weder Nitrat noch Nitrit.

Ammoniak wird von allen Stämmen in Spuren gebildet, von den menschenpathogenen Arten am wenigsten, von *N. ovis* relativ am stärksten.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

Allen, M. B., and C. B. van Niel: Experiments on bacterial denitrification. J. Bact. **64**, 397 (1952).

Berger, U.: Oxydationsfermente bei Veillonella alcalescens. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **146**, 440 (1960).

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7. Aufl., Baltimore 1957.

Clifton, C. E.: Introduction to bacterial physiology. New York, Toronto u. London 1957.

Hansen, P. A.: Ein neues Ammoniakreagens und seine Anwendung in der Bakteriologie. Zbl. Bakt., I Abt. Orig. **115**, 388 (1930).

Langford, G. C., J. E. Faber and M. J. Pelczar: The occurrence of anaerobic gram-negative diplococci in the normal human mouth. J. Bact. **59**, 349 (1950).

Lindquist, K.: A Neisseria species associated with infectious kerato-conjunctivitis of sheep — Neisseria ovis nov. spec. J. infect. Dis. **106**, 162 (1960).

Morris, E. O.: The bacteriology of the oral cavity. – IV (b) Neisseria. Brit. dent. J. **96**, 263 (1954).

Sacks, L. E., and H. A. Barker: Substrate oxidation and nitrous oxide utilization in denitrification. J. Bact. **64**, 247 (1932).

Sims, W.: The characteristics of some oral strains of Veillonella. Brit. dent. J. **108**, 73 (1960).

Wilson, G. S., and A. A. Miles: Topley and Wilson's Principles of Bacterlology and Immunity, 4. Aufl., London 1955.

Privatdozent Dr. med. Ulrich Berger,
Hamburg 20, Martinistr. 52

Zeitschrift f. Hygiene 148, 51—60 (1961)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Kiel (Direktor: Prof. Dr. H. Gärtner) und aus dem Institut für Milchhygiene der Bundesversuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel (Direktor: Prof. Dr. M. Seelemann)

Das Verhalten der Enterokokkenflora des Menschen nach oraler Verabreichung von Tetracyclin*

Von

H. Knothe und H. Mieth

(Eingegangen am 5. Juli 1961)

Die Zusammensetzung der Darmflora und ihre physiologische und pathogenetische Bedeutung ist seit einigen Jahren erneut Gegenstand zahlreicher Untersuchungen vieler Disziplinen der Medizin. Wenn sich auch heute allgemein die Ansicht hat durchsetzen können, daß die überwiegende Zusammensetzung der Darmbakterien aus mikroaerophilen und anaeroben Keimen besteht, und wenn weiterhin feststeht, daß die Bedeutung der Colibakterien erheblich überbewertet wurde, wie aus zahlreichen Arbeiten belegt werden konnte, so sind aber über genaue Zusammensetzungen gewisser Keimgruppen nur wenige und zum Teil sich widersprechende Angaben vorhanden.

Der Keimgehalt, besonders der des Dickdarmes, unterliegt sowohl qualitativ als auch quantitativ einer Vielzahl von äußeren und inneren Einflüssen, die teils milieu- bzw. ernährungsbedingt sind. Die quantitative Schwankungsbreite ist bei Menschen unter gleichen Lebensbedingungen relativ groß, wobei es aber bis heute noch eine offene Frage ist, wie weit Abweichungen gehen dürfen, ehe sie als pathologisch anzusehen sind. Durch zahlreiche Vergleichsuntersuchungen sind wir heute über einen Teil der äußeren Einflüsse auf die Darmflora unterrichtet. Hierbei spielt die Ernährung zweifellos eine große Rolle. Bei der Vielzahl der im Darm vorkommenden Bakterienarten ist es unmöglich, daß ein einzelner Untersucher, selbst wenn er imstande ist, mit Hilfe spezieller Nährböden den prozentualen Anteil der verschiedenen Keimgruppen festzulegen, innerhalb der verschiedenen Arten eine bis ins einzelne gehende Typisierung durchführen kann. So ist bekannt, daß sich die Coliflora des Menschen nicht nur aus biochemisch heterogenen, sondern auch aus verschiedenen Serotypen zusammensetzt. Da nur wenige Laboratorien auf der Welt die nötige Erfahrung zur Diagnostik der Colitypen besitzen, ist deshalb eine genaue Einteilung in der Routinediagnostik auch heute noch schwierig.

Auf Grund des Ausbaues von Differenzierungsmethoden für andere im Darm vorkommende, aerob wachsende Bakterienarten, wie z. B. der

* Die Arbeit wurde unter technischer Assistenz von Frau W. Schories und Fräulein W. Stolze mit Mitteln durchgeführt, die dankenswerterweise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, zur Verfügung gestellt worden sind.

Enterokokken, ist hier eine exakte Differenzierung leichter möglich. Der Anteil der Enterokokken an der Gesamtflora des Dickdarminhaltes des Menschen wird heute etwa zwischen 1—10% geschätzt.

Mit Hilfe von Elektiv- und Differenzierungsnährböden wie dem TTC-Agar nach Barnes und dem TKT-Agar nach Køhler-Ellingsen u. Hauge gelingt es mit einer gewissen Sicherheit, eine gezielte Isolierung der verschiedenen Enterokokkenarten durchzuführen. Eingehende Analysen über die qualitative Zusammensetzung der Enterokokkenflora des Menschen sind in letzter Zeit verschiedentlich veröffentlicht worden [Sharpe (1952); Guthof (1957/58); Moutoussis (1958); Buttiaux (1958) und Mieth (1961)]. Hiernach kann gesagt werden, daß beim gesunden Menschen mit dem Vorkommen aller bisher bekannten Enterokokkenarten, vornehmlich von Sc. faecalis (glycerinaceus), Sc. liquefaciens, Sc. faecium und seltener von Sc. zymogenes, Sc. durans sowie Sc. bovis, gerechnet werden muß.

Wenn auch durch die Art der Ernährung sowie durch eine Keimzufuhr mit den Nahrungsmitteln bzw. durch die Umwelt unter normalen Bedingungen in gewissen Grenzen eine Beeinflussung des Enterokokkenanteiles und wahrscheinlich jedes anderen Bakterienanteiles der Darmflora erfolgen kann, so scheinen aber grundsätzliche exogene oder endogene Einflüsse erforderlich zu sein, um einschneidende Verschiebungen in der Zusammensetzung der Darmflora herbeizuführen. Exogene Veränderungen sind durch bakteriostatische oder bactericide Arzneimittel, insbesondere von Antibiotica, gegeben. Unter Vernachlässigung der im Makroorganismus selbst zustande gekommenen Bedingungen, wie Sekretions- und Motilitätsstörungen, wurde das Verhalten der Enterokokkenflora nach oraler Applikation von Tetracyclin in therapeutischen Gaben von 1 g/die untersucht.

Diese Untersuchungen schienen uns deshalb von Bedeutung zu sein, da über das Verhalten der Enterokokkenflora nach oraler Gabe von antibiotischen Stoffen, insbesondere von Tetracyclinen, nur unvollkommene Angaben vorliegen. So ist zwar von Zanini u. Mitarb. (1954), D'Agata (1958), Haenel (1960) u. a. berichtet worden, daß es bei oraler Medikation von Tetracyclinen nicht zu einer Reduktion, sondern vielmehr zu einem Anstieg des Enterokokkenanteils der Darmflora kommt. Es ist aber hierbei das Verhalten der einzelnen Enterokokkenarten unberücksichtigt geblieben.

Bei der großen Bedeutung von Tetracyclinen, z. B. dem Chlortetracyclin und dem Oxytetracyclin als Beimischung zum Tierfutter, ist von veterinärmedizinischer Seite auch das Verhalten der Enterokokken bei Tieren geprüft worden. So wiesen Rolle u. Mitarb. (1955) darauf hin, daß der Enterokokkenanteil der Dickdarmflora von Meerschweinchen, denen Aureomycin mit dem Futter appliziert worden war, niemals eine Reduktion zeigte, sondern daß im allgemeinen ein Anwachsen der Enterokokkenflora beobachtet wurde. Eingehende Untersuchungen über die Enterokokkenflora und vor allem über den Anteil von Antibiotica-unempfindlichen Enterokokkenstämmen nach Verabreichung von nutritiven Dosen von Aureomycin wurden von Barnes (1958) sowie Elliott u. Barnes (1959) an Hühnern durchgeführt. Die Autoren beobachteten, daß der ursprünglich vorwiegend sensible Anteil

der Enterokokken durch Tetracyclin-unempfindliche Enterokokkenstämme, insbesondere durch einen bestimmten Sc. faecalis-(glycerinaceus)Stamm, verdrängt wurde. Nach Absetzen des Antibioticums waren innerhalb von 3 Monaten diese Antibiotica-unempfindlichen Stämme nicht mehr nachzuweisen. Der Enterokokkenanteil der Darmflora der Hühner wurde dann hauptsächlich von Sc. faecium und Sc. liquefaciens gebildet.

Methodik

Die eigenen Untersuchungen wurden an zehn klinisch darmgesunden, erwachsenen Personen durchgeführt, die an vier aufeinander folgenden Tagen täglich in sechsstündigen Intervallen viermal 250 mg eines handelsüblichen Tetracyclinhydrochlorids per os erhielten. Vor der Medikation wurden die Stuhlproben der betreffenden Personen mehrmals hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Enterokokkenflora und deren Primärresistenz gegenüber dem verabreichten Antibioticum untersucht. Während der Medikation wurden täglich und nach Absetzen des Antibioticums im allgemeinen am 2., 5., 8., 14. und 21. Tag Stuhluntersuchungen durchgeführt. Die Ernährung der zehn Versuchspersonen war eine gemischte Kost. Es handelte sich weiterhin bei diesen Personen nicht um hospitalisierte Patienten, sondern um solche, die in verschiedenartigsten Gemeinschaften lebten.

Die Zählung und Isolierung der Keime aus den Faeces erfolgte mit Hilfe des TKT-Agars nach Køhler-Ellingsen u. Hauge, auf dem verschiedene Verdünnungen von 1,0 g des Untersuchungsmaterials in Phosphatpufferlösung nach der Tropfmethode (Haenel u. Kunde 1956) aufgetropft wurden, und der, wie in den Arbeiten von Mieth (1960, 1961) ausführlich dargelegt worden ist, eine Unterscheidung der verschiedenen Enterokokkenarten auf Grund ihrer Wuchsformen mit weitgehender Sicherheit gestattet.

Zur Bestimmung des Antibiotica-empfindlichen Enterokokkenanteiles diente ebenfalls der TKT-Agar, dem zu diesem Zweck 50 mcg Tetracyclin/ml Nährmedium zugesetzt wurden. Von den hier gewachsenen Reinkulturen erfolgte anschließend eine Resistenzbestimmung nach dem Röhrchenverdünnungsverfahren. Die von uns ermittelten Resistenzwerte beziehen sich also sämtlich auf eine Resistenz, die wenigstens 50 mcg Wirkstoff/ml entsprach.

Von den TKT-Platten wurden gewöhnlich mehrere Kolonien auf Grund ihrer verschiedenen Wuchsformen isoliert und anschließend sowohl biochemisch als auch serologisch differenziert. Über Einzelheiten der Durchführung der Differenzierung ist bereits an anderer Stelle ausführlich berichtet worden (Mieth 1960, 1961).

Ergebnisse

Von den zehn Versuchspersonen wurden insgesamt 97 Stuhlproben qualitativ und quantitativ untersucht. 342 Enterokokkenkolonien wurden isoliert und biochemisch und serologisch bestimmt. Bei den differenzierten Stämmen handelt es sich überwiegend um Sc. faecalis (glycerinaceus), Sc. liquefaciens und Sc. faecium sowie in selteneren Fällen um Sc. zymogenes und sogenannte „atypische" Enterokokken. Sc. durans wurde nicht gefunden.

Tabelle 1. *Schwankungen der Verteilung der Enterokokkentypen, insbesondere des tetracyclinunempfindlichen Anteiles, vor, während und nach Gaben von Tetracyclin*
(4×250 mg täglich vom 17.1.1960 bis 20.1.1960)

Proband	Typ	Zeit	13. 1.	15. 1.	18. 1.	19. 1.	20. 1.	22. 1.	25. 1.	1. 2.	4. 2.	16. 2.
	Sc. faecium		200	30	10 (0,04)	20 (0,006)	30	90 (7)	900 (5)	9 (0,006)	90 (0,007)	3
	Sc. faec. (v. glyc.)		10 (0,04)	19 (0,09)	20	700 (0,8)	400 (400)	195 (78)	600	185 (0,003)	18	3
Nr. 3	Sc. faec. (v. zymog.)		—	—	—	—	—	5 (2)	—	—	2 (0,01)	—
	Sc. faec. (v. liquef.)		50	1	—	—	—	—	—	15	—	—
	Sc. bovis		—	—	—	—	—	—	200	—	—	—
	Atypische Enterok.		—	9 (9)	—	0,5 (0,5)	—	—	—	—	—	—
	Sc. faecium		2	0,02	0,6	6 (6)	0,021 (0,018)	400 (20)	600 (1)	4	—	—
	Sc. faec. (v. glyc.)		4	0,03	—	0,5 (0,5)	—	—	0,5	—	—	—
Nr. 6	Sc. faec. (v. zymog.)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,007 (0,007)
	Sc. faec. (v. liquef.)		—	0,2	0,06	4,5 (4,5)	400 (400)	500 (100)	29,5 (3)	0,9 (0,004)	0,3	—
	Sc. bovis		—	0,04	—	—	—	—	—	—	0,3	0,4
	Atypische Enterok.		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Sc. faecium		0,3	0,05	400	3000 (3000)	2000 (2000)	2000 (400)	7 (0,06)	10 (0,5)	3 (0,05)	0,6 (0,02)
	Sc. faec. (v. glyc.)		0,7	0,006	—	—	—	495 (400)	20 (0,03)	40	7,3	2
Nr. 9	Sc. faec. (v. zymog.)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Sc. faec. (v. liquef.)		4	17 (0,08)	90 (60)	500 (500)	300 (300)	5 (0,03)	—	20 (0,7)	—	—
	Sc. bovis		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Atypische Enterok.		—	—	—	—	—	—	—	5	—	—

Gesamtkeimzahl der Enterokokken in Millionen/1,0 g Faeces. (Die in Klammern gesetzten Zahlen bedeuten den Anteil an tetracyclinunempfindlichen Enterokokken.)

Die in der Tab. 1 zusammenfassend dargestellten und von drei Versuchspersonen ermittelten Untersuchungsergebnisse wurden als repräsentativer Querschnitt aller Untersuchungen erachtet und sollen im einzelnen ausführlich besprochen werden.

Die Enterokokkenflora der *Versuchsperson Nr.3* bestand vor der Medikation in etwa zu gleichen Teilen aus Sc. faecium und Streptokokken der Faecalisgruppe sowie aus einem geringen Anteil von sogenannten „atypischen" Enterokokken. Die Faecalisgruppe wies einen geringen Prozentsatz an primär resistenten Keimen auf. Nach der Verabreichung des Antibioticums stiegen die Keimzahlen an, und der Sc. faecium sowie die sogenannten „atypischen" Enterokokken wurden durch Angehörige der Faecalisgruppe zurückgedrängt. Am 3. Tag der Medikation war diese vornehmlich durch Vertreter der Faecalisgruppe gebildete Enterokokkenflora gegenüber dem Antibioticum fast völlig resistent. Die Anzahl der resistenten Keime verringerte sich deutlich bereits innerhalb von 2 Tagen nach Absetzen des Tetracyclins, und die wieder erstandene Antibiotica-empfindliche Flora setzte sich vornehmlich aus Sc. faecium und Angehörigen der Faecalisgruppe sowie vorübergehend zu einem kleinen Teil aus Sc. bovis zusammen.

Der Enterokokkenanteil der Darmflora der *Versuchsperson Nr. 6* zeigte vor der Medikation eine wechselnde Beteiligung der verschiedenen Enterokokkenarten mit einer etwas stärkeren Beteiligung von Keimen der Faecalisgruppe. Primär resistente Enterokokken ließen sich nicht nachweisen. Am Anfang der Therapie wuchs der Anteil von Sc. faecium vorübergehend an, es stellte sich aber bereits nach wenigen Tagen wieder eine stärkere Ansiedlung von Keimarten aus der Faecalisgruppe fest. Mit dieser anteilmäßigen Verschiebung ging ein Anstieg der Resistenz und ein Anwachsen der gesamten Enterokokkenflora einher. Nach Absetzen des Antibioticums sank der Anteil der resistenten Enterokokken an der Gesamtflora rasch ab und war nach 5 Tagen nicht größer als ca. 3%. Damit ging wieder eine Vermehrung von Sc. faecium einher, der ein Ansteigen von Sc. bovis mit einer fast völligen Unterdrückung der übrigen Enterokokkenflora bei sinkenden Gesamtkeimzahlen folgte.

Die *Versuchsperson Nr. 9* wies 2 Tage vor Verabreichung des Antibioticums eine Enterokokkenflora auf, deren Zusammensetzung hauptsächlich aus Keimen der Faecalisgruppe bestand. Unter der Tetracyclingabe kam es rasch zu einer Verschiebung dieses Verhältnisses zugunsten eines stärkeren Auftretens von Sc. faecium, der bis zum Absetzen des Antibioticums zum vorherrschenden Typ innerhalb der Enterokokkenflora wurde. Parallel hierzu stiegen die Gesamtenterokokkenzahlen stark an, um ab 7. Untersuchungstag wieder etwa auf die Ausgangswerte zurückzugehen. Zu diesem Zeitpunkt traten neben Sc. faecium und der wieder dominierenden Faecalisgruppe Sc. bovis und sogenannte „atypische"

Enterokokken mit einem geringen Anteil in Erscheinung. Der geringe Prozentsatz Tetracyclin-unempfindlicher Enterokokken (Sc. liquefaciens) vor der Therapie wurde schnell durch weitere Tetracyclin-unempfindliche Enterokokken vergrößert. So zeigten sich am 2. Behandlungstage etwa 14% der Enterokokkenflora als resistent; hieran war ausschließlich die Faecalisgruppe beteiligt. Am 3. und 4. Tag der Medikation verhielt sich die gesamte Enterokokkenflora resistent, die nunmehr überwiegend aus Sc. faecium bestand, während der Anteil der Faecalisgruppe sich kaum vergrößert hatte. 4 Tage danach waren die resistenten Keime auf 34% der Gesamtenterokokkenflora und in den folgenden 3 Wochen auf 1—3% zurückgegangen.

Diskussion

Die auf Grund vorliegender Untersuchungen ermittelten Ergebnisse über das Verhalten des Enterokokkenanteils der Dickdarmflora des Menschen nach oraler Applikation von therapeutischen Gaben von Tetracyclin geben im Hinblick auf die in der Literatur veröffentlichten Angaben zu einer kritischen Betrachtung Veranlassung, da von den meisten Autoren über das Verhalten der Enterokokkenflora im Verlauf einer Tetracyclintherapie nur orientierende Beobachtungen vorliegen. Bei den zehn von uns in die Versuche einbezogenen nicht hospitalisierten Versuchspersonen konnte während der Therapie in keinem Falle eine stärkere Reduktion der Enterokokken beobachtet werden, wenn auch bei insgesamt drei Personen am Anfang der Medikation eine geringe Reduktion der Keimzahl auftrat. Es folgte aber rasch unter der Therapie wieder eine Zunahme des Enterokokkenanteiles, wobei die erreichten Keimzahlen pro Gramm Faeces in vielen Fällen höher lagen als vor der Verabreichung des Antibioticums. Betrugen die Ausgangswerte der Enterokokken einige Millionen Mikroorganismen/Gramm Faeces, so ließen sich während und kurze Zeit nach der Therapie Werte ermitteln, die um 1—3 Zehnerpotenzen höher lagen (Tab. 2). Dieses Verhalten konnte nicht nur in dieser Versuchsgruppe festgestellt werden, sondern zeigte sich auch bei zahlreichen weiteren Versuchspersonen, von denen aus anderen Fragestellungen Stuhlproben untersucht worden waren. Diese über die Anfangswerte hinausgehende Vermehrung gewisser Bakterienarten unter und nach einer Therapie mit chemotherapeutischen Substanzen ist für den Colibakterienanteil schon seit längerer Zeit bekannt (Knothe; Seeliger u. a.). Ebenfalls ist von D'Agata eine mäßige Vermehrung des Enterokokkenanteiles in einzelnen Fällen bei einer längeren Verwendung der Tetracycline berichtet worden.

Dieses Verhalten dürfte eine Erklärung darin finden, daß bei einer oralen Verabreichung von Tetracyclinen zunächst der sensible Enterokokkenanteil bakteriostatisch gehemmt wird, ohne daß allerdings alle

betreffenden empfindlichen Mikroorganismen ganz ausgeschaltet werden. Während und nach diesem Zeitpunkt, den wir als Reduktionsphase bezeichnen können, kommt es nun zu einer vermehrten Wucherung von primär resistenten Anteilen, die endo- und exogener Herkunft sein können. So findet man bei genauer Analyse bei gesunden, nicht mit Antibiotica behandelten Versuchspersonen fast regelmäßig geringe Anteile von Tetracyclin-unempfindlichen Enterokokken. Diese Stämme können sich rasch vermehren, so daß etwa vom 2.—3. Tag nach Einsetzen der Therapie der sensible Anteil unter 0,1% liegt. Die beträchtliche Erhöhung des resistenten Enterokokkenanteiles gegenüber der vorher überwiegend sensiblen Flora läßt sich allerdings nur schwer erklären. Ob dies der Ausdruck einer Schädigung der Abwehrkräfte des Makroorganismus selbst ist, erscheint zweifelhaft. Möglicherweise könnte die Erhöhung nicht nur des Enterokokkenanteiles, sondern auch des Colibakterienanteiles durch das Fehlen von bakteriellen Antagonismen ausgelöst werden, da bekannt ist, daß unter einer oralen Therapie mit Tetracyclinen der anaerobe Laktobakterienanteil innerhalb kurzer Zeit völlig zurückgeht, sich aber nach Absetzen der Therapie innerhalb 8—14 Tagen wieder normalisiert (Haenel; Knothe; Petuely u. Lindner). So konnte auch bei allen Versuchspersonen parallel mit dem Wiederansteigen des anaeroben

Tabelle 2. *Schwankungen der Gesamtenterokokkenkeimzahlen in Millionen/1,0 g Faeces des Erwachsenen im Verlauf einer oralen Medikation von Tetracyclin*
(4×250 mg täglich in der Zeit vom 17.1. bis 20.1.1960)

Proband	Zeit	13. 1.	15. 1.	18. 1.	19. 1.	20. 1.	22. 1.	25. 1.	1. 2.	4. 2.	16. 2.
I		0,08	90,5	430	260	440	2300	600	40	60	—
II		7,5	5,5	0,237	0,09	10	600	300	120	9	4,5
III		260	59	30	720,5	430	290	1700	209	110	6
IV		0,82	14	20	0,039	600	900	500	26	340	47
V		7	0,72	96	10100	31000	9400	28	8	1,9	—
VI		6	0,29	0,66	11	400	900	630	4,9	0,6	0,407
VII		0,88	5	906	2020	2800	11000	3000	29	0,38	0,79
VIII		0,06	0,003	0,148	400	1900	1500	1100	110	5,8	2
IX		4,73	17,1	490	3500	2300	2500	27	75	10,3	2,6
X		4,3	9,8	20	150	290	80	60	16	5	1,0

Laktobakterienanteiles eine Reduktion des Enterokokkenanteiles zu den Ausgangswerten hin beobachtet werden.

Andererseits könnte die Erhöhung des Enterokokkenanteiles auch mit der etwas beschleunigten Darmpassage während einer oralen Tetracyclindosierung erklärt werden, zumal Herrmann u. Hoffmann beobachtet haben, daß auch nach Abführmitteln eine Vermehrung des Enterokokkenanteiles im Stuhl auftritt. In diesem Zusammenhang erhebt sich auch die Frage, ob der gelegentlich während und nach einer oralen Tetracyclintherapie auftretende Pruritus Ani, der nach zahlreichen Autoren durch eine Vermehrung von Candida albicans ausgelöst werden soll (Grimmer u. a.), möglicherweise durch die Vermehrung des Enterokokkenanteiles bedingt sein könnte.

Der Anteil der resistenten Enterokokkenstämme wird nach Absetzen des Antibioticums innerhalb weniger Tage durch Antibiotica-sensible Stämme wieder ersetzt. Diese Regeneration spielte sich bei allen zehn untersuchten Versuchspersonen im Durchschnitt innerhalb 1 Woche ab. Sie kann einmal darin begründet sein, daß die resistenten Stämme eine geringere Virulenz besitzen; so ist bekannt, daß beispielsweise Antibiotica-unempfindliche Colibakterien drei- bis viermal so rasch phagozytiert werden wie sensible Stämme. Man könnte aber auch annehmen, daß die Regeneration der sensiblen Enterokokkenflora exogener Herkunft sein kann. So ist z.B. der Nachweis von Sc. bovis, der normalerweise beim Menschen nur in geringeren Mengen nachweisbar ist, mit großer Regelmäßigkeit dann möglich, wenn der Mensch entweder einen ständigen Umgang mit Tieren bzw. tierischen Ausscheidungen hat (wie Landwirte) bzw. fast ausschließlich von tierischen Produkten wie Milch ernährt wird (Säuglinge und Kleinkinder).

Die am Anfang der Medikation in Erscheinung tretende Reduktion und das Auftreten einer Resistenz sind auf Grund unserer Untersuchungen nicht an das Vorhandensein bestimmter Enterokokkenarten gebunden, sondern sind von Fall zu Fall variabel und werden vielmehr durch den Anteil primär resistenter Stämme bedingt sein. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle ließen sich resistente Stämme von Sc. faecalis (glycerinaceus) und Sc. faecium nachweisen. Wir haben aber auch gesehen, daß gelegentlich andere Arten wie Sc. liquefaciens, Sc. zymogenes und Sc. bovis daran beteiligt sein können. Bei hospitalisierten Patienten könnte es dagegen durchaus möglich sein, daß hier je nach Umständen bestimmte resistente Enterokokkenarten dominieren. Dieses ist auch bei Tieren der Fall, die sowohl gleichen Stall- als auch gleichen Ernährungsbedingungen unterworfen sind. So berichtete Barnes bei Hühnern, daß bei allen Tieren ein bestimmter Stamm von Sc. faecalis, wahrscheinlich durch eine fortwährende Reinfektion aus der Umgebung, als Repräsentant einer resistenten Enterokokkenflora auftrat.

Die Verschiebung des sensiblen Enterokokkenanteiles zugunsten eines resistenten Anteiles ist mit Sicherheit nicht für die Ursache enteritischer Erscheinungen verantwortlich zu machen.

Zusammenfassung

Wiederholte qualitative und quantitative Differenzierungen des Enterokokkenanteiles der Dickdarmflora bei Versuchspersonen nach therapeutischen Gaben von Tetracyclin (viermal 250 mg täglich oral für die Dauer von 4 Tagen) ergaben:

1. Nur bei drei von insgesamt zehn Probanden stellte sich am 1. Tag der Medikation eine geringe Reduktion der Enterokokkenkeimzahlen ein, der aber eine reaktive Vermehrung während der Therapie über die Ausgangswerte hinaus folgte.

2. Während der Therapie kam es in allen Fällen zum Auftreten von Tetracyclin-unempfindlichen Enterokokken, das nicht an das Vorhandensein bestimmter Enterokokkenarten gebunden war.

3. Nach Absetzen der Medikation erfolgte durchschnittlich innerhalb von 7 Tagen ein Verschwinden des resistenten Enterokokkenanteiles und das Wiederauftreten von empfindlichen Arten.

Literatur

D'Agata, A.: Wirkungen des Tetracyclins bei längerer Anwendung auf die Faecalflora. Rif. med. **72**, 285 (1958).

Barnes, E. M.: The effect of antibiotic supplements on the faecal streptococci (Lancefield group D) of poultry. Brit. vet. J. **114**, 33 (1958).

Buttiaux, R.: Les streptocoques fécaux des intestins humains et animaux. Ann. Inst. Pasteur **94**, 778 (1958).

Elliott, S. D., and E. M. Barnes: Changes in serological type and antibiotic resistance of lancefield group D streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline. J. gen. Mikrobiol. **20**, 426 (1959).

Grimmer, H.: Antibiotica und Pilzerkrankungen der Haut und Schleimhaut. Antibiot. et Chemother. (Basel) **1**, 180 (1954).

Guthof, O.: Streptokokken und Dysbakterie-Problem. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **170**, 327 (1957/58).

Haenel, H.: Aspekte der mikroökologischen Beziehungen des Makroorganismus. Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **176**, 1 (1960).

Haenel, H., u. Ch. Kunde: Vergleichende quantitative Untersuchungen über Caecalflora und Kotflora von Ratten. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **165**, 107 (1956).

Herrmann, W., u. K. Hoffmann: Die Bedeutung der heutigen „Dysbakterie"-Forschung für die Diagnose von Erkrankungen des Verdauungsapparates. Med. Mschr. **13**, 203 (1959).

Knothe, H.: Über die Veränderungen der Darmflora unter dem Einfluß einer Therapie mit Tetracyclinen. Dtsch. med. Wschr. **82**, 1685 (1957).

Mannweiler, E., u. F. Meins: Bakteriostatische Untersuchungen zur Frage der Resistenz der D-Streptokokken. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **166**, 367 (1956).

Mieth, H.: Untersuchungen über das Vorkommen von Enterokokken bei Tieren und Menschen. I. Mitteilung: Ihr Vorkommen im Darm von gesunden Schlachtschweinen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **179**, 456 (1960).

Mieth, H.: Untersuchungen über das Vorkommen von Enterokokken bei Tieren und Menschen. II. Mitteilung: Ihr Vorkommen in Stuhlproben von gesunden Menschen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **183**, 68 (1961).

Moutoussis, K., J. Papavassiliou u. V. Samaraki-Lyberopoulou: Streptococcus faecalis als Beweis der menschlichen Verunreinigung der Lebensmittel. Vorkommen des Sc. faecalis in menschlichen und tierischen Faeces. Acta Microbiol. Hell. **3**, 231 (1958).

Petuely, F., u. G. Lindner: Untersuchungen über die Regulationsmechanismen für die Darmflora und ihre Beeinflussung durch Terramycin. Bedeutung des bakteriellen Umgebungsmilieus für die Darmflora. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **169**, 178 (1957).

Rolle, M., u. H. Mayer: Experimentelle Studien über die Entwicklung von Meerschweinchen und die Änderung ihrer Darmflora nach Verabreichung von Aureomycin. Zbl. Vet.-Med. **2**, 692 (1955).

Seeliger, H. P. R.: Das Dysbakterieproblem vom Standpunkt des Mikrobiologen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **170**, 288 (1957/58).

Seeliger, H. P. R.: Probleme der mikrobiellen Besiedlung des Darmtraktes. Dtsch. med. Wschr. **83**, 629 (1958).

Sharpe, M. E.: Group D-streptococci in the faeces of healthy infants and of infants with neonatal diarrhoea. J. Hyg. (Lond.) **50**, 209 (1952).

Zanini, A., R. Pezzi, G. Verdura e E. Fione: Modificazioni della flora intestinale e dei processi di emocoagulazione nei neonattanti trattati con aureomicina a scopo profilattico. Boll. Ist. sieroter. milan. **33**, 568 (1954): ref. Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **166**, 345 (1958).

Professor Dr. med. Hans Knothe,
Hygiene-Institut der Universität, Kiel, Brunswikerstraße 2—6
Dr. Hubert Mieth,
Kiel, Hermann Weigmann-Str. 3/11

Zeitschrift f. Hygiene 148, 61—68 (1961)

Behringwerke AG, Marburg/Lahn

Experimentelle Untersuchungen über die Konkurrenz der Antigene *

Von

W. Hennessen, L. Körner und R. Mauler

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Juli 1961)

Das Problem einer Konkurrenz der Antigene wird diskutiert, seitdem aus wissenschaftlichen oder praktischen Gründen mehrere Antigene gleichzeitig und in Mischung appliziert wurden. In den letzten Jahren hat es erneut an Interesse gewonnen, als man dazu überging, zu den bisherigen Impfstoffen auch Virusantigene zuzusetzen, wie dies z. B. in Poliomyelitis-Kombinations-Impfstoffen, aber auch bei der Mischung von Influenza- und Adenovirus-Antigen der Fall ist. Schmidt[8] äußerte die Ansicht, daß das Problem, seit der Herstellung der ersten „vaccines associées" von Ramon[7], überschätzt worden sei. Wir möchten das Phänomen zunächst einmal wertfrei auffassen und in einer Konkurrenz mehr einen Wettbewerb sehen, der keineswegs unbedingt zu einer Unterdrückung, sondern ebenso auch zu einer Verstärkung der einzelnen Wettbewerbsteilnehmer führen kann.

Es ist seit langem bekannt (Landsteiner; van der Scheer; Boyd[1,3–5]), daß Antigene Komplexe von reaktiven Gruppen darstellen, gegen die getrennte Antikörper gebildet werden. Demnach stellen auch die in einzelnen Impfstoffen verwendeten Antigene keine Einheiten, sondern Antigengruppen dar. Obwohl damit bereits die gleichzeitige Antikörperbildung durch mehrere Antigene ohne eine gegenseitige Unterdrückung grundsätzlich schon geklärt ist, haben wir unsere Untersuchungen an Mischungen von mehreren dieser Antigenkomplexe, wie sie für die menschliche Immunisierung in Impfstoffen benutzt werden, durchgeführt. Wir haben dabei das gleiche Mischungsverhältnis gewählt, wie es in den Impfstoffen der angegebenen Art vorliegt. Die Fragestellung bei unseren Experimenten lautete: Welche Antikörpermenge wird durch die betreffenden Antigene im Organismus gebildet, wenn diese Antigene allein oder mit anderen kombiniert verabfolgt

* Auszugsweise als Vortrag auf der 28. wissenschaftlichen Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie in Düsseldorf vom 2.—5. Mai 1961 gehalten.

werden. Voraussetzung für eine solche vergleichende Betrachtung ist selbstverständlich, daß nur Vergleichbares miteinander verglichen werden kann.

Material und Methoden

1. Tetanustoxoid. Das Antigen wurde so hergestellt, daß es den Prüfungsvorschriften[12] entsprach. Der Herstellungsgang richtete sich dabei nach den NIH-Vorschriften[13]. Der Gehalt an Flockungseinheiten sowie an Adsorbens geht aus Tab. 1 hervor. Die Bestimmung der „Schutzeinheiten" sowie der Antitoxineinheiten erfolgte ebenfalls nach den staatlichen Vorschriften[12,13].

Tabelle 1. *Antigen- und Adjuvans-Gehalt der Versuchsvaccinen* (pro Dosis f. d. Menschen)

Vaccine	Tetanus-Toxoid Lf	Diphtherie-Toxoid Lf	Pertussis-Keimsuspension in Mia. Keimen	$Al(OH)_3$ %
Tetanus	17	—	—	0,20
Diphtherie	—	25	—	0,20
Tetanus-Diphtherie	5,1	11,25	—	0,20
Tetanus-Diphtherie-Pertussis	3,4	7,5	15	0,1
Tetanus-Poliomyelitis	9,25	—	—	0,1
Diphtherie-Tetanus-Poliomyelitis	17,3	29,4	—	0,1
Diphtherie-Pertussis-Tetanus-Poliomyelitis	9,8	14,75	15	0,1

2. Diphtherietoxoid. Herstellung und Prüfung richteten sich auch hier nach staatlichen Vorschriften[14,15]. Die Zusammensetzung der einzelnen Versuchsvaccinen geht aus Tab. 1 hervor.

3. Pertussis-Suspension. Die Keimsuspension bestand aus abgetöteten B. pertussis Bakterien der Phase I, die entgiftet und gereinigt waren. Die Keimzahl der einzelnen Impfstoffe wurde nach dem Standard der National Institutes of Health eingestellt und ist der Tab. 1 zu entnehmen.

4. Poliomyelitis-Antigen. Der Poliomyelitis-Impfstoff enthielt die drei Virustypen als formaldehydinaktivierte Antigene. Es wurde nur Material verwendet, das die staatliche Prüfung[16] bestanden hatte. Die Auswertung erfolgte hier am Meerschweinchen[16], am Küken[10] oder am Affen[17].

Unsere Versuche führten zu den folgenden Resultaten:

Tetanustoxoid

Das Antigen wurde allein und in verschiedenen Kombinationen auf seine Fähigkeit geprüft, schützende Antikörper im Meerschweinchen zu bilden. Die gemessenen „Schutzeinheiten" wurden auf die Menge des injizierten Antigens bezogen, so daß ein Quotient SE/Lf resultierte. Bei der Prüfung der humoralen Tetanus-Antikörper bezogen wir die

gebildeten Antitoxineinheiten auf die zur Immunisierung verwendete Antigenmenge, so daß der Quotient AE/Lf gewonnen wurde. Die Ergebnisse beider Untersuchungen zeigt Abb. 1. Diese graphische Darstellung zeigt, daß die Kombinationen Tetanus mit Diphtherie fast doppelt so viele Schutzeinheiten (1,92) und Antitoxineinheiten (1,83) hervorgerufen haben wie das allein applizierte Tetanustoxoid. Die Inkorporation einer Pertussiskeimsuspension als drittes Antigen führte zu einer weiteren Steigerung der Tetanuswerte: für Schutzeinheiten 6,9, Antitoxineinheiten 3,7. Es erscheint bemerkenswert, daß die Antitoxineinheiten jeweils von den zusätzlichen Kombinationspartnern etwas weniger verstärkt werden als die Schutzeinheiten.

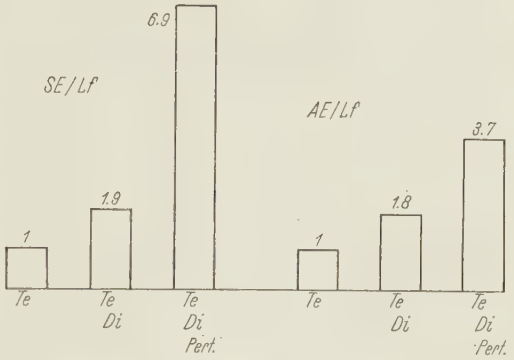


Abb. 1. Wirksamkeit von Tetanus-Toxoid bei den angegebenen Antigen-Kombinationen

Diphtherietoxoid

Auch bei dem Diphtherie-Antigen haben wir die Ergebnisse in Quotienten ausgedrückt, die sich wieder auf die Menge des injizierten Antigens beziehen. Abb. 2 gibt die Verhältnisse für Diphtherie wieder. Auch hier zeigt sich, daß die Kombination des Diphtherietoxoids mit Tetanus zu einer Erhöhung der gebildeten Schutzeinheiten (1,3) und Antitoxineinheiten (1,3) führt. Der Effekt ist in dieser Zweifachkombination für das Diphtherietoxoid geringer als für das Tetanustoxoid. Ob das Diphtherietoxoid für das Tetanustoxoid eine größere Verstärkung hervorruft als umgekehrt, bleibt noch zu klären. Die Vergesellschaftung dieser Kombination mit Pertussiskeimen führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Wirksamkeit: für Schutzeinheiten 6,2, für Antitoxineinheiten 3,1. In dieser Dreifachkombination ist der Effekt der Verstärkung für das Diphtherieantigen praktisch derselbe wie der für das Tetanusantigen.

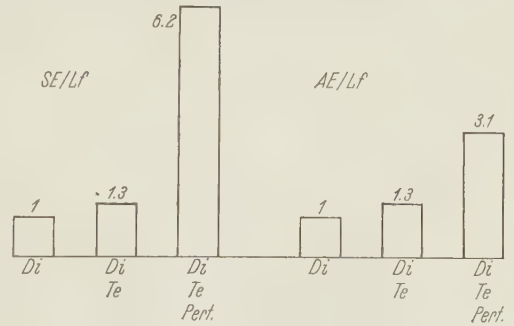


Abb. 2. Wirksamkeit von Diphtherie-Toxoid bei den angegebenen Antigen-Kombinationen

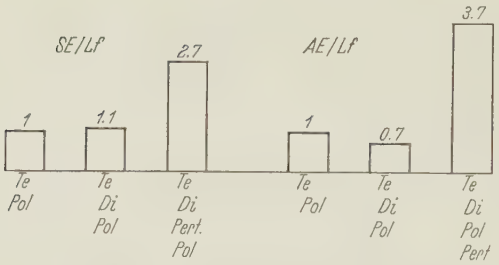


Abb. 3. Wirksamkeit von Tetanus-Toxoid bei den angegebenen Antigen-Kombinationen

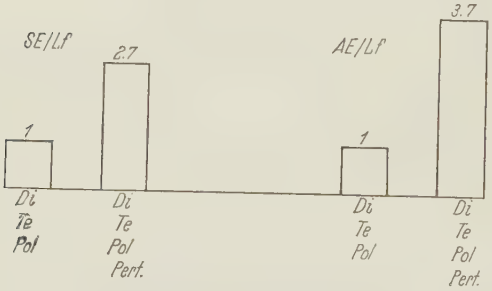


Abb. 4 Wirksamkeit von Diphtherie-Toxoid bei den angegebenen Antigen-Kombinationen

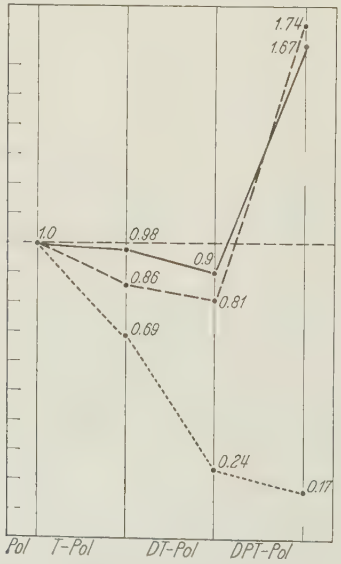


Abb. 5. Wirkungsprüfung des Polio-Antigens in Polio-Kombinations-Vaccinen an verschiedenen Tieren. Affen (3 Inj.) ●——●; Küken (1 Inj.) ●- - - -●; Meerschweinchen (3 Inj.) ●— —●

Die Wirkung von Tetanus- und Diphtherietoxoiden wurde außerdem in Präparaten untersucht, welche zusätzlich Poliomyelitis-Antigen enthielten. Da hier andere Adjuvansmengen zur Verwendung kommen, außerdem das Injektionsschema von der vorgenannten Untersuchungsreihe abweicht, können die dabei gewonnenen Werte nur unter sich verglichen werden. Abb 3 zeigt, daß auch in den hier aufgeführten Kombinationen eine Erhöhung der Schutzeinheiten für Tetanus (1, 1,1 und 2,7) eintritt, die sich ebenfalls bei den Antitoxineinheiten (1, 0,7 und 3,7) nachweisen läßt. Bei den Antitoxinwerten fällt lediglich derjenige der Dreifachkombiation DT/Pol geringgradig ab. Die Ursache hierfür scheint in der Tatsache zu liegen, daß die Auswertungsmethodik infolge abweichender Dosierung nicht streng vergleichbar ist. Abb. 4 zeigt die gleichen Verhältnisse für Diphtherie. Die Vierfachkombination bringt eine Erhöhung der Diphtherie-Schutzeinheiten (2,7) und Antitoxineinheiten (3,7) gegenüber der Dreifachkombination.

Polioantigen

Die Prüfung der Poliowirkung erfolgte an verschiedenen Tierarten, weil wir schon früher gefunden hatten, daß die Poliomyelitis-Antikörperbildung in verschiedenen Tierspecies unterschiedlich verläuft. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 5 zusammengefaßt. Unsere Experimente zeigten, daß im Meerschweinchentest eine negative Beeinflussung der Poliomyelitis-Antikörperbildung bei kombinierter Antigenzufuhr eintritt. Wählt man dagegen andere Versuchstiere, z. B. Affen oder Küken, dann tritt auch für das Polioantigen eine Steigerung seiner Wirkung ein. Diese Befunde, über die wir bereits im vergangenen Jahr berichteten[2], wurden inzwischen von SCHEIBEL[7] und WILSON[11] bestätigt.

Diskussion

Für die Toxoid-Antigene führte die gegenseitige Beeinflussung zu einer Steigerung der antigenen Wirksamkeit.

Für das Poliomyelitis-Antigen konnte eine Abhängigkeit seiner Wirkung von der Art der Versuchstiere sowie der Versuchsanordnung festgestellt werden. Dabei kommt es im Meerschweinchenversuch zu

Tabelle 2. *Poliomyelitis-Wirkungsprüfung*
Inj.-Volumina nach Art und Gewicht der Tiere

Spezies	Anzahl der Injektionen	Vol. pro Injektion ml	Ges. Vol. pro kg Körpergewicht ml
Affe	3	1,0	1,5
Küken	1	1,0	5,0
Meerschweinchen	3	2,0	24,0

einer Verringerung der antigenen Wirkung, während im Affen oder Küken die Poliomyelitiswirkung bei Toxoidzusatz gleichbleibt; wenn eine Pertussiskeimsuspension zugesetzt wird, steigt sie dagegen ebenfalls an. Mit diesen Befunden finden Untersuchungen eine Bestätigung, welche STITZ[9] vor 22 Jahren in unserem Hause an Toxoiden und bakteriellen Antigenen vornahm.

Die Ursache für das unterschiedliche Ansprechen verschiedener Tierspecies auf die gleichen Antigene kann entweder in der Testmethodik oder in der Reaktionsweise des Organismus liegen. Wir haben beide Möglichkeiten überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß die Versuchsanordnung für das Meerschweinchen außerordentlich ungünstige Verhältnisse schafft, weil mehr als 20 ml pro Kilogramm Körpergewicht injiziert werden (Tab. 2). Dadurch entstehen für die Antikörperbildung abträgliche Bedingungen, die unter Umständen sogar bei einzeln injizierten Antigenen nur zu einem niedrigen Antikörperspiegel führen können. Detaillierte Untersuchungen hierzu stehen bei uns kurz vor dem

Abschluß. Nach den bisherigen Ergebnissen sind wir der Ansicht, daß durch entsprechende Versuchsbedingungen auch beim Meerschweinchen die Verminderung der Polio-Antikörperbildung nach kombinierten Antigenen verhindert werden kann. Die Untersuchung der Eigenart des tierischen Organismus und seiner Reaktionsweise auf verschiedene Antigene stößt beim Küken insofern auf Schwierigkeiten, als diese Tiere bei der Kürze der Versuchsdauer keine Antikörper gegen Diphtherie oder Tetanus bilden. Es handelt sich hierbei um eine zeitlich bedingte und nicht um eine grundsätzliche Nichtansprechbarkeit von Küken

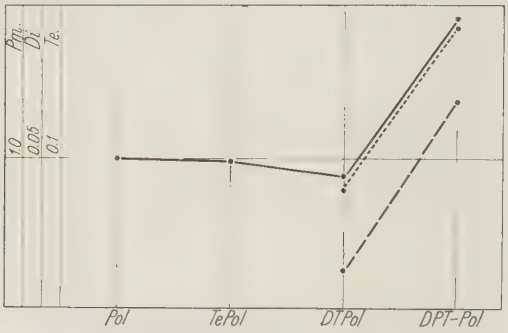


Abb. 6. Antikörperbildung durch Mischantigen am Affen (AE/Lf). Polio ●——●; Di ●——●; Tet ●----●

durch diese Antigene. Im Affenversuch liegen diese Verhältnisse günstiger. Hier wird ein kleineres Volumen pro Kilogramm Körpergewicht injiziert. Außerdem läßt die Versuchsanordnung den Tieren Zeit, gegen alle injizierten Antigene Antikörper zu bilden. Dementsprechend lassen sich beim Affen Antikörper gegen alle kombiniert applizierten Antigene nachweisen (Abb. 6).

Die geschilderten Experimente zeigen, daß durch Antigenmischungen eine Wirksamkeitssteigerung hervorgerufen wird, die mit der von Adjuvantien verglichen werden kann. Neben den praktischen Konsequenzen für die Herstellung, Prüfung und Anwendung von Impfstoffen haben die mitgeteilten Ergebnisse auch theoretische Bedeutung für die heutigen Antikörperbildungstheorien. Wenn nämlich die Annahme zu Recht besteht, daß die Menge Antikörper pro Zelle eine Konstante ist, dann können die obigen Befunde sowie die Adjuvanswirkung nur als Effekt einer Erhöhung der Zahl der antikörperbildenden Zellen aufgefaßt werden. Wird aber die Zahl der Zellen als konstant angenommen, dann müßte jede Art verstärkter Antikörperbildung als eine Erhöhung des Antikörperausstoßes der einzelnen Zellen betrachtet werden. Uns erscheint die letztgenannte Ansicht unwahrscheinlich, nicht zuletzt deshalb, weil seit Ramon immer wieder gezeigt werden

konnte, daß bei Verstärkung von Antigenen durch Adjuvantien eine Zellvermehrung eintritt. Das Produkt aus der Reaktion zwischen Zelle und Antigen wird demnach durch die Darreichungsform des Antigens beeinflußt, welche ihrerseits die Zellzahl verändern kann.

Zusammenfassung

Das Problem der Konkurrenz der Antigene wurde an Tetanus-, Diphtherie-, Pertussis- und Poliomyelitis-Antigen experimentell im Tierversuch geprüft. Für die Auswertung fanden die vorgeschriebenen quantitativen Methoden Anwendung. Die Experimente ergaben, daß eine gegenseitige Beeinflussung der Antigene erfolgt. In den meisten Fällen äußert sich diese als eine Steigerung der antikörperbildenden Fähigkeit der Antigene. Bei der Auswertung des Poliomyelitis-Antigens ließ sich nachweisen, daß die Art der gegenseitigen Beeinflussung von der verwendeten Tierspecies abhängt. In der Auswertung am Affen und Küken wurden Steigerungen durch Kombination, in der Auswertung am Meerschweinchen dagegen eine Unterdrückung der Poliomyelitis-Komponente beobachtet. Die Bedeutung der Befunde für die Antikörperbildung wird diskutiert.

Literatur

[1] Boyd, W. C.: Fundamentals of Immunology. New York: Interscience Publishers Inc. 1947.

[2] Hennessen, W., R. Mauler u. L. Körner: Proceedings 6th International Congress of Microbiological Standardization. Wiesbaden 1960, S. 129 Berlin-Zehlendorf: H. Hoffmann-Verlag.

[3] Landsteiner, K.: The Specificity of Serological Reactions, S. 119. Springfield/Ill.: Ch. C. Thomas 1936.

[4] Landsteiner, K.: The Specificity of Serological Reactions, S. 56. Cambridge/Mass.: Harvard University Press 1945.

[5] Landsteiner, K., and J. van der Scheer: On Cross Reactions of Immune Sera by Azoproteins. J. exp. Med. **67**, 709 (1938).

[6] Ramon, G.: La vaccination antidiphtérique et la vaccination antitétanique au moyen des anatoxines spécifiques et les vaccinations associées dans la pratique. Rev. Immunol. (Paris) **1**, 37 (1935g).

[7] Scheibel, I.: Kopenhagen (persönliche Mitteilung).

[8] Schmidt, H.: Fortschritte der Serologie, S. 364, 2. Aufl. Darmstadt: Verlag Dr. Dietrich Steinkopff 1955.

[9] Stitz, B.: Gibt es eine Konkurrenz der Antigene? Ein Beitrag zur Frage der aktiven Immunisierung mit Mischimpfstoffen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **143**, 437 (1939).

[10] Timm, E. A., E. Z. Rope and I. W. McLean jr.: Chick Potency Tests of Poliomyelitis Vaccine: Basic Studies on Response. I. Immunol. **80**, 407 (1958).

[11] Wilson, R. J.: Toronto (persönliche Mitteilung).

[12] Vorschriften für die staatliche Prüfung der Impfstoffe zur aktiven Schutzimpfung gegen Wundstarrkrampf (Tetanus). RdErl. d. RMdI. v. 28.6.1939 — IV g 1261/39—5792. Reichsministerialblatt f. inn. Verwaltg. Nr. 27, 1382 (1939).

[13] Minimum Requirements "Tetanus Toxoid", 4th Revision, December 15, 1952 Federal Security Agency, National Institutes of Health, Bethesda.
[14] Vorschriften für die staatliche Prüfung der Impfstoffe zur aktiven Schutzimpfung gegen Diphtherie. RdErl. d. RuPr. MdI. v. 13.12.1935 — IV C 2939/35. Reichsministerialblatt f. innere Verwaltg. Nr. 52, 1526 (1935).
[15] Minimum Requirements "Diphtheria Toxoid", 4th Revision, March 1, 1947. Federal Security Agency, National Institutes of Health, Bethesda.
[16] Dritte Fassung der „Vorläufigen Vorschriften für die staatliche Prüfung von Impfstoffen gegen Kinderlähmung (Poliomyelitis)". Staats-Anzeiger f. d. Land Hessen, Nr. 12, 344 (1959).
[17] Regulation of Biological Products, part 73. Public Health Service Publication No. 437, revised June 1960.

Privatdozent Dr. med. Walter Hennessen,
Marburg/Lahn, Behringwerke AG.

Zeitschrift für Hygiene 148, 69—93 (1961)

Aus der Geomedizinischen Forschungsstelle der Heidelberger Akademie der Wissenschaften in Heidelberg (Leiter: Professor Dr. med. Ernst Rodenwaldt)

Dritter Bericht über das Vordringen der Tularämie nach Mittel- und Westeuropa über den Zeitraum von 1950 bis 1960

Von

H. J. Jusatz

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Juli 1961)

Seit 25 Jahren ist die Tularämie beim Menschen auch in Mitteleuropa von Zeit zu Zeit in epidemischer Form aufgetreten, nachdem sie im Lande ihrer Entdeckung, in den Vereinigten Staaten von Amerika, ebenso wie in Rußland und Japan — den beiden Ländern, in denen ihr Vorkommen in den zwanziger Jahren unseres Jahrhunderts ebenfalls bakteriologisch und serologisch gesichert werden konnte — als eine autochthone Seuche der Nagerwelt dieser großen Gebiete erkannt worden war. In zwei Berichten wurde 1939 und 1952 in dieser Zeitschrift über ihr Vordringen von Ost- nach Mittel- und Westeuropa berichtet (Jusatz[32,33]). Der vorliegende dritte Bericht soll dem weiteren Verhalten der Tularämie im vergangenen Jahrzehnt zwischen 1950 und 1960 gelten und die von Girard[24] aufgeworfene Frage beantworten, ob die Tularämie bereits heute als eine in großen Teilen Europas heimisch gewordene Seuche angesprochen werden muß. Die weiteren Ausführungen gelten der Klärung der zweiten Frage, welche geomedizinischen Bedingungen die künftige Entwicklung dieser für Europa neuen Seuche bestimmen.

Die folgenden Tabellen sollen die bisher in dieser Zeitschrift veröffentlichten Übersichten über das Vordringen der Tularämie in Europa für das letzte Jahrzehnt bis 1960 ergänzen und auf die Bedeutung dieser inzwischen weit verbreiteten Seuche für den Gesundheitsdienst in den europäischen Ländern aufmerksam machen.

I. Die epidemiologische Entwicklung der Tularämie in Europa zwischen 1950 und 1960

Wenn man die beigegebene Karte (Abb. 1) über das Vorkommen von Tularämie in Europa bis 1960 mit der Verbreitungskarte des zweiten Berichtes (Bd. 134, S. 352, Abb. 1) vergleicht, dann scheint die Westwärtsbewegung dieser für Europa neuen Seuche zu einem gewissen Stillstand gekommen zu sein, jedenfalls sind —

abgesehen von einem kürzlich gemeldeten Vorkommen in Italien — keine neueren Eintragungen westlich der Begrenzungslinie von 1950 in Europa hinzugekommen. Die drei großen Wellen des epidemischen Vordringens der Tularämie, die von mir im Welt-Seuchen-Atlas beschrieben und kartographisch dargestellt worden sind (Jusatz[35]), scheinen keine Fortsetzung in einer vierten Welle gefunden zu haben.

Dagegen ist es im letzten Jahrzehnt zu wiederholtem Aufflackern der Seuche in den bekannten Herdgebieten in Europa gekommen (Tab. 1), wobei auch eine Ausdehnung der einzelnen Herdgebiete in die Umgebung mit einer gewissen Westrichtung erfolgt ist, so z. B. im Marchfeld, an der unteren Oder, in Mainfranken

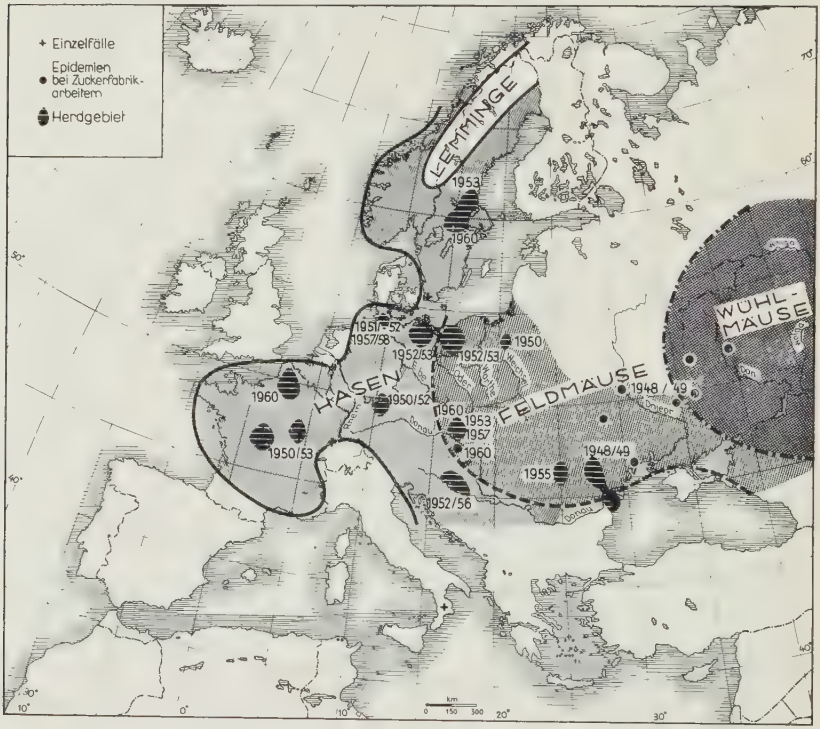


Abb. 1. Vorkommen von Tularämie beim Menschen in Europa 1950—1960

am Steigerwald (Abb. 2), in Frankreich, Kroatien und Rumänien. Auch die ersten Berichte aus Jugoslawien über Vorkommen von Tularämiefällen in einigen Dörfern südlich von Agram längs der Save abwärts bis Nova Gradiska (Mihaljevic[51,52]; Falisevac[18]) bestätigten die bereits früher ausgesprochene Vermutung (Jusatz[33]) eines epizootischen Vorkommens bei Hasen in Jugoslawien. Tatsächlich waren bereits im Jahre 1946 in Laibach drei Schlächter nach Abbalgen von Hasen aus der Wojwodina erkrankt[52].

Die erste große Epidemie in Rumänien betraf nach Condrea u. Mitarb.[12] im Winter 1948/49 die Moldau und die Schwarzmeerküste, offenbar im Zusammenhang mit dem massiven Auftreten von Tularämie in der Ukraine (Tab. 3), denn es wurden auch in Rumänien Feldmäuse und Hausmäuse als Zwischenträger festgestellt. Im Winter und Frühjahr 1955 erkrankte eine größere Anzahl von Jägern in

einigen Dörfern Siebenbürgens nach der Jagd von Hamstern, von denen damals monatlich bis zu 20000 erlegt wurden. Vor Beginn dieser Epidemie wurde ein Verschwinden der Feldmäuse beobachtet. In der gleichen Gegend fiel ein starkes Hasensterben auf. Cornelson u. Mitarb.[13,14] zeigten in einer Karte das Ineinandergreifen der Verbreitungsareale von *Arvicola terrestris* mit *Cricetus cricetus* in der Moldau als Erklärung für den Übergang von *P. tularensis* auf die Hamsterpopulation (Tab. 2). Auch aus dem benachbarten Ungarn wurden seit 1954 Erkrankungen an Tularämie beim Menschen an die WHO gemeldet, es fehlen jedoch nähere Angaben. Über ein weiteres Vorkommen in der europäischen Türkei, im Nistgebiet des Thrakischen Beckens, standen keine neuen Berichte zur Verfügung.

Eine besondere Art der Verbreitung stellt die in der Berichtszeit mehrfach beobachtete Streuung von Einzelfällen oder Gruppenerkrankungen durch infiziertes Wildbret in die nächstgelegenen Großstadte dar. Hier erkrankten besonders Angestellte und Käufer von Wildbret in Wildhandlungen (Pöhlig[63] nennt die Tularämie sogar eine „Handelsseuche").

Außerdem kamen in der Berichtszeit vermehrt Einzelfälle zur Beobachtung, bei denen die Infektion in einer Gegend ohne erkennbaren Zusammenhang mit einem der bekannten Herdgebiete erfolgte. Sie lassen auf ein zumindest sporadisches Vorkommen von Infektionen mit *P. tularensis* im Hasenbestand oder bei Nagern der betreffenden Gegend schließen. Da der Mensch im allgemeinen aber nur in sehr beschränktem Maße mit erkrankten Hasen, Feldmäusen, Hamstern, Bisamratten, deren Ektoparasiten oder mit Verunreinigungen von diesen Nagern in unmittelbaren Kontakt kommt, wird die Zahl der sporadischen Fälle immer gering bleiben. Es kann sich allerdings in einigen Fällen später herausstellen, daß sie als Vorboten einer entstehenden Verseuchung hätten aufgefaßt werden sollen, worauf einzelne Beispiele aus den vorausgegangenen epidemischen Ausbrüchen hinweisen.

Die starken Schwankungen im Vorkommen von Tularämiefällen beim Menschen in den einzelnen Jahren hängen mit Schwankungen in den Nagerpopulationen der gleichen Gegend zusammen. Für die jüngsten Zunahmen in den letzten Jahren lassen sich einige Angaben machen. Die größte Verbreitung in Mittel- und Westeuropa wies die starke Feldmausgradation des Jahres 1949 auf. Die Massenvermehrungen der Feldmäuse in den Jahren 1952 und 1957 traten nur gebietsweise auf. Die erste große Feldmausplage seit 1949 mit allgemeiner Verbreitung, besonders im Süden Mitteleuropas, wurde dann im Jahre 1959 beobachtet, zweifellos durch die Witterung begünstigt (Frank[21]). Der Dürresommer 1959 bewirkte auch eine ungewöhnlich starke Vermehrung der Hasen, dagegen einen Rückgang der Großen Wühlmaus *Arvicola terrestris*. Zu der Zahl der amtlich gemeldeten Fälle (Tab. 1) ist meist noch eine größere Anzahl von Erkrankungsfällen hinzuzufügen, die durch die amtlichen Ermittlungen nicht erfaßt oder sogar verheimlicht werden. Andererseits enthalten die amtlichen Statistiken immer wieder eine Anzahl von ursprünglich als Tularämie gemeldeten Erkrankungsfällen, die durch spätere genaue Erhebungen sich nicht bestätigen ließen. So konnten durch eigene Nachforschungen einige ursprünglich in den Statistischen Berichten des Statistischen Bundesamtes gemeldete Erkrankungsfälle von Tularämie aus Hamburg, Hildesheim, Osnabrück und aus anderen Orten als nicht bestätigt festgestellt werden. Auch die Statistiken der WHO enthalten Ungenauigkeiten, so z. B. über Meldungen aus Venezuela. Nach einer Mitteilung von Prof. Dr. L. Briceno Iragorry[10], Institut für Tropenmedizin der Universität Caracas, wurden einige Fälle in das Statistische Jahrbuch aufgenommen, die sich jedoch bei einer Nachprüfung nicht als Tularämie erwiesen haben. Dieser Irrtum ist für die Jahre 1954—1956 in die offizielle Statistik der WHO[17] übernommen worden. Selbst Peltiers[62] Bericht über ein erstes Vorkommen von Tularämie in Westafrika bei Dakar muß heute in Übereinstimmung mit der

Ansicht von Girard[25] als Irrtum bezeichnet werden (Jusatz[38]). Nach ihm sind bisher noch niemals sichere Tularämiefälle in Westafrika festgestellt worden.

Die Zahlenreihen über Tularämie beim Menschen in Europa (Tab. 1) zeigen deutlich, daß sich in bestimmten Gegenden einzelner europäischer Länder bereits Niststätten des Tularämieerregers in der heimischen Fauna gebildet haben müssen, von denen aus *P. tularensis* in einzelnen Jahren infolge einer Massenvermehrung von Nagern seuchenhaft hervorbrechen

Tabelle 1. *Gemeldete Fälle von Erkrankungen an Tularämie in einigen Ländern Europas 1950—1960*

	Norwegen	Schweden	Polen	Bundesrepublik Deutschland	Österreich	Frankreich	Belgien	Ungarn	Jugoslawien
1950	—	.	.	20	45	191	26	.	.
1951	—	.	.	117	26	64	—	.	.
1952	—	.	.	55	28	49	5	.	.
1953	2	307	.	8	80	9	6	.	.
1954	—	54	.	7	10	4	—	8	15
1955	—	1	21	10	16	4	—	28	7
1956	—	46	8	3	23	4	—	17	3
1957	—	6	6	14	67	6	—	4	—
1958	.	10	9	33	17	1	.	38	.
1959	.	9	.	4a	45	9	.	.	.
1960	.	214a	.	2a	~600a	15b	.	.	.

a) vorläufige Angaben; b) nur I. Quartal; — kein Fall gemeldet; . Angaben fehlen.

und auch beim Menschen zu epidemischen Häufungen von Erkrankungsfällen an Tularämie führen kann. Die in Tab. 3 zusammengestellten Ausbrüche zwischen 1950 und 1960 lassen also die erste Frage nach einer Fortdauer der Verseuchung der Nagerwelt Europas positiv beantworten. Die Westwärtsbewegung der Tularämie scheint zwar zu einem gewissen Stillstand gekommen zu sein, aber die Seuche ist inzwischen in Europa zu einer autochthonen Zoonose geworden.

II. Der gegenwärtige Stand der Verseuchung

In Tab. 3 wird versucht, alle bisherigen Angaben über Vorkommen von Tularämie in Europa bis 1960 zu vervollständigen. Diese Liste gibt zusammen mit den bereits veröffentlichten Übersichten* ein anschauliches Bild von der im Laufe von 35 Jahren langsam fortgeschrittenen Entwicklung der Verseuchung der Nagerwelt zwischen den großen russischen Steppen im Osten, in denen

* Diese Zeitschrift **122**, 356; **134**, 356 und 363.

ausgedehnte Epizootien bei Wühlmäusen *(Arvicola terrestris)*, Feldmäusen (*Microtus arvalis*), Hasen, Kaninchen, Hamstern und Lemmingen wahrscheinlich mit Millionenverlusten unter diesen Nagerpopulationen abgelaufen sind, und jenen Befallsgebieten in der Kulturlandschaft Mitteleuropas, in denen mit weniger starken Nagergradationen gerechnet werden muß. Die jährlichen Abschußzahlen bei den Hasenstrecken in der Bundesrepublik zeigen jedoch, daß auch hier beträchtliche Populationen anzutreffen sind, die für eine Infektion mit *P. tularensis* empfänglich sind.

Dieser Zusammenstellung müßte eigentlich eine Liste mit den Angaben über den negativen Ausfall früherer Untersuchungsbefunde bei größeren Nageruntersuchungen auf Vorkommen von Tularämie in Mitteleuropa vorausgeschickt werden, bei denen der Nachweis von *P. tularensis* trotz intensivster Bemühungen nicht gelang und daher auf das Fehlen einer ausgedehnten Verseuchung in früheren Jahren geschlossen wurde (Henninger[28,29] in Deutschland, Eicke[15] für die Umgebung von Berlin, Verge[86] in Frankreich, Legezynski[46] in Polen und Galli-Valerio[23] in der Schweiz). Diese Befunde sprechen mit den weiter unten angeführten Beobachtungen für die Tatsache, daß tatsächlich eine Ausdehnung eines großen Seuchenareals unter den Nagern von Ost nach West in den letzten vier Dezennien erfolgt sein muß. Hierbei bleibt vorläufig die Frage noch ungeklärt, wieweit westwärts gerichtete Tierwanderungen, Eingriffe des Menschen durch Versetzen von Hasen in fremde Jagdreviere oder Vogelflug diese Ausdehnungserscheinungen mitbewirkt haben. Auffällig ist jedenfalls die exponierte geographische Lage einiger Fundstellen, so z. B. die Halbinsel Eiderstedt, die Schwarzmeerküste Kleinasiens sowie der isolierte Fund in Calabrien (Cinelli[11]; Neri[58]). Für die beiden letztgenannten Gebiete wurden, wie auch in Nordamerika, Wachteln als Überträger genannt.

Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß nicht jedes auffällige Nagersterben auf Tularämie zurückzuführen ist. Für Niederösterreich wiesen Flamm, Kovac u. Loew[19] eine Infektion mit *P. multocida* als Ursache eines vermehrten Feldmaussterbens im Herbst 1959 nach.

Die Übersicht über die verschiedenen Vorkommen in Europa in Tab. 3 zeigt aber neben dem erneuten Wiederaufflackern der Seuche in den altbekannten Herdgebieten vom Marchfeld, von Gävleborg, von der unteren Oder usw. nunmehr auch im mitteleuropäischen Raum eine Erscheinung der Tularämie in Form von Massenerkrankungen beim Menschen, die bisher nur auf Osteuropa beschränkt zu sein schien, nämlich bei den Arbeitern einer Zuckerfabrik während der Zuckerkampagne in Bruck an der Leitha in Österreich infolge von Verunreinigungen der Rübenschnitzel durch infizierte Feldmäuse (Puntigam[64,65]; Flamm u. Wiedermann[20]). Diese Erscheinungsform als Berufserkrankung — nicht mehr als „Aufsuchkrankheit" (Rimpau[67]) — verdient besondere Aufmerksamkeit, weil sie zeigt, daß auch in anderen Gegenden Mittel- und Westeuropas mit Massenerkrankungen beim Menschen unter gewissen Umständen gerechnet werden muß, wenn die Verseuchung der Feldmauspopulationen in Mitteleuropa weiter fortschreiten sollte.

Hierbei tritt an die Stelle des selteneren unmittelbaren Kontaktes zwischen dem erkrankten Nagetier und dem Menschen die mittelbare Übertragung, indem durch Verunreinigungen, die von Nagern ausgehen, der Erreger durch Staub oder Wassertröpfchen auf den Menschen übergehen kann. Auch durch Wasser aus verseuchten Wasserläufen sind Infektionen in Amerika und Rußland beobachtet worden (Jusatz[38]). Für den aerogenen Infektionsweg spricht bei den Erkrankten die vorwiegend thorakale Symptomatologie, die den europäischen Ärzten seit den im zweiten Weltkrieg im Süden Rußlands gemachten Erfahrungen bekanntgeworden war (Bieling[6,7]), und die auch in Österreich zur Entdeckung der eigentlichen Ursache der Massenerkrankungen in der Zuckerfabrik geführt hat (Friza[22]).

Dieses Vorkommnis erscheint besonders bedeutungsvoll, weil es zum ersten Male anzeigt, daß jetzt auch in Mitteleuropa ausgedehnte Feldmauspopulationen als tularämieverseucht angesehen werden müssen. Im Zusammenhang mit dem früher dargestellten wellenförmigen Verlauf der bisherigen Vorstöße der Seuche von Ost nach West und dem dabei erfolgten Übergang des *P. tularensis* von dem ursprünglichen Reservoirtier in Rußland, der Großen Wühlmaus *Arvicola terrestris*, auf die Feldmaus *Microtus arvalis* (Abb. 1) muß in der beobachteten Tatsache der Verseuchung der Mäusepopulationen eines großen Einzugsgebietes einer Zuckerfabrik ein erstes Anzeichen für eine drohende Gefährdung weiterer Gebiete Mitteleuropas gesehen werden.

III. Die geomedizinischen Bedingungen für die weitere Entwicklung

Während der 25 Jahre, in denen nunmehr Tularämievorkommen in Europa beobachtet wurden, hat sich die bereits 1940 geäußerte Ansicht (Jusatz[34]) bestätigt, daß sich ein epizootisch-epidemisches Auftreten der Tularämie in Europa bevorzugt in Gegenden abspielt, die sich durch eine Zugehörigkeit zu besonderen Klimagebieten und durch eine bestimmte Prägung ihres Landschaftscharakters auszeichnen. Dadurch findet auch die Ungleichmäßigkeit des Befalls in den verschiedenen Teilen Europas ihre Erklärung. Zur Beantwortung der Frage, warum sich die Tularämie als Nagerseuche nur in ganz bestimmten Gebieten Europas eingenistet hat, muß eine landschaftsökologische Analyse für jedes Nistgebiet durchgeführt werden, um diejenigen geographischen Faktoren zu finden, von denen die Lebensäußerungen des tierischen Überträgers und Reservoirs abhängen.

Für den russischen Raum zeigte die Grenze der großen Steppengebiete des Südens zu den ausgedehnten Waldgebieten des Nordens auch die räumliche Begrenzung der großen russischen Seuchenwellen an (Abb. 1). In den Waldgebieten war nur eine geringe Verbreitung der Tularämie zu beobachten, sie hat sie aber durchschritten, um sich in entfernteren Prädilektionsgebieten festzusetzen, die

durch ihre besonderen klimatischen Bedingungen und lokalen Vegetationsverhältnisse der ursprünglichen Steppenlandschaft ähnlich erscheinen. Besonders ausgezeichnete Trockengebiete geben dann auch die Grundlage für das erste Einnisten der Tularämie im mitteleuropäischen Raum, im Mährischen Becken nördlich von

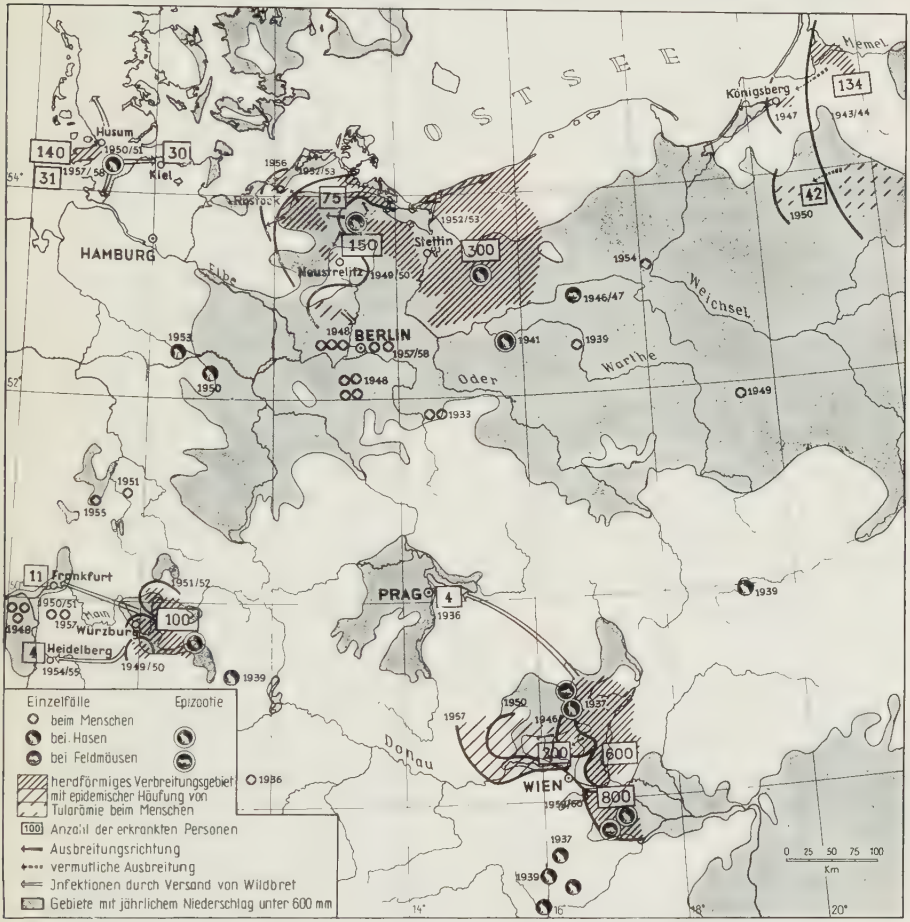


Abb. 2. Die epidemische Verbreitung der Tularämie in Mitteleuropa bis 1960

Wien, an der unteren Oder und am Main, in dem am weitesten nach Osten vorgeschobenen wärmsten Klimaraum Süddeutschlands. In Abb. 2 sind diese Gebiete mit Jahressummen des Niederschlags unter 600 mm durch eine graue Tönung hervorgehoben.

Die klimatischen Bedingungen stellen jedoch nur *einen* Faktor dar, der für die Nagerökologie von Bedeutung ist. Zur Kennzeichnung weiterer geobiologischer Bedingungen, aus denen die Bereitschaft einer Landschaft zur Aufnahme eines Seuchenreservoirs für die Tularämie abgeleitet werden kann, sind jene Gebiete der natürlichen Vegetation

heranzuziehen, die nach Hueck[30] den ursprünglichen Steppencharakter einer Landschaft am klarsten zum Ausdruck bringen. In Mitteleuropa sind es Gebiete, die Steppenheidewald aus Eichen, Hainbuchen, Elsbeeren mit Resten von Steppenrasen aufweisen, der meist nur noch als lokalklimatisch bedingte Vegetationsform anzutreffen ist, wie z. B. im Marchfeld, am Main und an der unteren Oder (Jusatz[37]).

Eine steppenähnliche Landschaft stellen auch die Marschen an der Westküste Schleswig-Holsteins dar. Hier in dieser baumlosen Landschaft, die von kleinen Gräben durchzogen ist, finden Wühlmäuse und Feldmäuse zusagende Lebensbedingungen. Die Plastizität des Marschbodens erleichtert die Anlage unterirdischer Gänge und Nester. Im Winter geben Dämme und Deiche Schutz vor Nässe und Überschwemmung. Der Gras- und Kleebestand des Weidelandes bietet eine Nahrungsquelle, welche nicht durch Feldbestellungsarbeiten gestört wird. Diese Bedingungen lassen auch hier die Ausbildung eines Reservoirgebietes für die lokale Aufrechterhaltung von *P. tularensis*-Infektionen möglich erscheinen.

Auch Gebiete mit wiederholtem Vorkommen von Tularämie in Frankreich werden durch hohe Sommertemperaturen und milde Winter gekennzeichnet, worauf bereits im zweiten Bericht hingewiesen wurde (S. 368). Im Laufe der vergangenen 10 Jahre hat sich an diesem Verhalten nichts wesentlich geändert.

Innerhalb der genannten Gebiete mit klimatischen Besonderheiten, die das Ökoklima eines Nistgebietes des *P. tularensis* darzustellen scheinen, geben besondere lokale Verhältnisse in einzelnen klimatisch begünstigten Zeitabschnitten Anlaß zu erheblichen Gradationen nicht nur der Nager dieser Gebiete, sondern auch ihrer Ektoparasiten, besonders der Zecken. Bestimmte Teile dieser Landschaften können dabei ein Aktionszentrum für die Zecken darstellen. Hier sind besonders wildbewachsene Feld- und Waldraine, die Reste von Steppenrasen an den sonnenreichen Keuperabhängen des Steigerwaldes, die exponierten Hänge pontischer Hügel auf Kalkuntergrund in der Côte d'Or und in anderen Gebieten Frankreichs mit den mikroklimatischen Voraussetzungen für eine lokale Steppenvegetation anzuführen. Ohne ein derartiges Biochorion wäre die Ausbildung eines Dauerherdgebietes der Tularämie in Mittel- und Westeuropa wahrscheinlich nicht denkbar.

Im Sinne des wissenschaftlichen Systems einer Synökologie (Tischler[84]) lassen sich die ökologischen Verhältnisse der einzelnen Befallsgebiete untereinander vergleichen und dadurch Isozönosen für Krankheitsvorkommen in verschiedenen geographischen Räumen aufstellen (Tab. 2). Hierbei sind Vergleiche bis in Einzelheiten des verschiedenen Landschaftsaufbaues möglich. Einer derartigen synökologischen Betrachtung wird es vorbehalten bleiben müssen, diejenigen Leitsymptome

Tabelle 2. *Beispiele für Isozönosen der Tularämie*

	Deutschland Frankreich	Schweden	Ukraine	Rußland Rumänien	Vereinigte Staaten von Amerika
Biomtyp	Niederschlagsarme Gebiete mit kontinentalem Klima u. Resten steppenähnlicher Vegetation	Niederschlagsarme Gebiete	Niederschlagsarme Gebiete, Steppen	Niederschlagsarme Gebiete, Kontinentalklima, Steppen, Flußuferlandschaften	Steppen, Prärien, Weideland
Erreger	P. tularensis	P. tularensis	P. tularensis	P. tularensis	P. tularensis
Reservoir u. Überträger	Zecken	Zecken, Milben	Zecken, Milben	Zecken, Milben	Milben, Zecken
Wirtstier:	Hasen	Hasen, Lemminge	Feldmäuse	Gr. Wühlmaus, Hamster	Hasen, Wildkaninchen, Schafe
Kontakt	Jagd, Wildbret	Jagd, Insekten	Verunreinigung von Lebensmitteln, Zuckerrüben	Pelzgewinnung	Jagd, Insekten, Waldarbeit, Schafhaltung u. -verarbeitung
Endwirt	Mensch	Mensch	Mensch	Mensch	Mensch

Tabelle 3. *Das weitere Vordringen der Tularämie von Ost- nach Mittel- und Westeuropa 1950—1960*

Nr.	Jahr	Landschaft	Durchschnittl. jährl. Niederschlagsmenge in mm	Jahreszeit	Anzahl der Fälle	Nagerart und Überträger	Erwähnt von
				I. Nordeuropa			
				1. Norwegen			
1	1953	Einzelfälle in Norwegen			2		Epid. Vit. Stat. Rep. WHO *13*, 580 (1960)
				2. Schweden			
2	1953	erneuter epidemischer Ausbruch in den alten Herdgebieten von Gävleborg	500	Juli bis Sept.	307 davon 256 in Gävleborg	Lemminge, Hasen, Eichhörnchen (*Aedes* als Überträger)	Olin [59] Lilleengen [48,49] Borg u. Nyström [9] Ljung [50]
3	1958	im Gebiet von Malmö		Juni bis Sept.	6		Björkman u. Mitarb. [8] Borg u. Nyström [9]
4	1960	neues epidemisches Auftreten			230 davon 95 in Gävleborg 53 in Västernorrland 51 in Kopparberg		Olin (pers. Mitt. vom 19. 12. 60) Thal (pers. Mitt. vom 20. 12. 60)
				II. Osteuropa			
1	Mitte der 40er Jahre	Sowjetunion			~100000 jährlich	verschiedene Nager, blutsaugende Arthropoden	Shdanow [77]
2	Ende der 50er Jahre	Sowjetunion			einige hundert Fälle jährlich	desgl.	Shdanow [77]

3	ohne Jahresangabe	in einer Zuckerfabrik		15. Dez. bis Ende Jan.	30—40% aller Fabrikarbeiter	Mausähnliche Nager	Lewtschenko (zit. n. Shmuter[78])
4	1946	im Gebiet von Kursk und Woronesch, Schramskow und Poltawa	500	im Winter während der Verarbeitg. der Rüben	einige Arbeiter in Zuckerfabriken	ohne Angaben	Shmuter[78]
5	1948/49	Steppengebiete im europ. Teil der Sowjetunion	400	Winter	nicht angegeben 30% Lungenaffektionen	Epizootie bei mausähnl. Nagern Kontakt durch Staub u. Sprühen beim Waschen d. Rüben	Mjasnikow (zit. n. Shmuter[78])
6	1948/49	im Kursker u. Woronescher Bezirk und in Anbowsky Massenerkrankungen von Zuckerfabrikarbeitern	500	Ende Nov. bis Dez.	1081 Erkrankungen* im I. Quartal 1949 von 22517 Zukkerfabrikarbeit.	Epizootie zu Herbstende 1948 bei starker Vermehrung der Feldmäuse	Shmuter[78]
7	1948/49	in der Kongreß-Zuckerfabrik in Charkow			239 Erkrankungen		
8	1948/49	in Petrow bei Charkow	500		122 Erkrankungen		
9	1948/49	in Zuckerfabriken im Kiewer			643 Erkrankungen		
10	1948/49	in Zuckerfabriken des Bezirkes von Winniza	500	zur Zeit der Verarbeitung der Zuckerrüben in den Fabriken zu Beginn d. Winters	1200 Erkrankungen		Shmuter[78]
11	1948/49	in Odessa, Kruschkowskoi, u. im Gaiweronsker Bezirk	300—400		~ 400 Erkrankungen		

* Die tatsächliche Zahl der Erkrankungen war bedeutend höher.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Nr.	Jahr	Landschaft	Durchschnittl. jährl. Niederschlagsmenge in mm	Jahreszeit	Anzahl der Fälle	Nagerart und Überträger	Erwähnt von
12	1948/49	im Kirograder Bezirk (in 2 Fabriken)			unbekannt		Shmuter[78]
13	1948/49	im Berigonowsker und im Bodwisker Bezirk			400 Erkrankungen		
		2. Stromgebiet der Weichsel und Warthe					
14	vor 1939	in Posen	500		1 Stamm isoliert wahrscheinlich *P. tularensis*		Adamski (zit. n. Parnas-Dombrowski[60]
15	1939	Pszczyna (nahe der Grenze der Tschechoslowakei)	750		1 Stamm isoliert	aus einem kranken Hasen	Parnas (zit. n. Parnas-Dombrowski[60]
16	1942	Kreis Birnbaum (Warthe)	500		1 Stamm isoliert	Epizootie bei Hasen	Schoop[72]
17	1949	Lodz			unbekannt		Parnas, Rozowski u. Wysocka[61]
18	1950	im Gebiet von Warschau	500		unbekannt		Kassur[40]
19	1952	im Gebiet von Bialystok			unbekannt		Parnas, Rozowski u. Wysocka[61]
20	1956	Verseuchung in einzelnen Gemeinden		Dez.	11 Gehöfte in 8 Gemeinden		Tierseuchen-Bericht[83]
21	1960	Neuerkrankungen		Mitte Sept.	30 Neuerkrankungen		
		III. Mitteleuropa					
		1. Ostseeküste: östlich der Oder					
1	1945/47	im Gebiet von Stettin	500			Massenvermehrung der Nager Epizootie unter Feldmäusen	Simm[79]
2	1950	im Gebiet von Allenstein	500		Epidemie, 41 Fälle		Zembrzuski[88]

3	1952/53	im Gebiet östlich von Stettin epidemisches Auftreten unter der Landbevölkerung	500—600	Dez.-Mai	rd. 300 Fälle, davon 179 untersucht, 106 klinisch diagnostiziert. 5 Stämme isoliert (SKRODZKI)	Im Herbst 1952 Massenvermehrung der Nager. Hasen als Hauptquelle. *Microtus arvalis*, Zecken, Insekten, Schweine.	KACPRZAK[39] ROZOWSKI[68,69] PARNAS, ROZOWSKI u. WYSOCKA[61]
						600 Hasen waren negativ; von 1157 Kühen waren 1,9—2,8% serolog. positiv 7 Stämme isoliert aus *Ixodes ricinus*	SKRODZKI[80]

2. Ostseeküste: westlich der Oder

Vorpommern-Mecklenburg

4	1950	Borken (Waldgegend im Kreis Ückermünde)	500—600	Frühjahr	5 Familienerkr. (93 Personen untersucht, 8 serolog. positiv)	Hasen	RUSS u. BRIEGER[70]
5	1950	Mecklenburg (ohne nähere Ortsangabe)	500—600	Juli	1 Biß-Erkrank.	Zecke	JUNG[31]
6	1952/53	Zweite Epidemie in Ostmecklenburg (Greifswald, Malchin, Löcknitz, Prenzlau, Neustrelitz)	500	Juni bis Frühjahr	89	64 Pers. = 71,9% durch Hasen infiziert	MOCHMANN u. OTTE[57]
7	1953	Ostmecklenburg, besonders Kreis Malchin	500		4		UNGER[85]
8	1953/55	Einzelfälle in und aus 2 Orten um Greifswald und in den Kreisen Gnoien u. Malchin	500		11	Hasen	MOCHMANN[54,55]
9	1955	Demmin			1	Hase	MOCHMANN[53–55]

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Nr.	Jahr	Landschaft	Durchschnittl. jährl. Niederschlagsmenge in mm	Jahreszeit	Anzahl der Fälle	Nagerart und Überträger	Erwähnt von
10	1956	ohne nähere Ortsangaben			8 (erste Isolierung eines Stammes in Mecklenburg)	Übertragung durch Insektenstiche?	Mochmann[53–55]
11	1960	Umgebung von Greifswald, Anklam	500		4	Kontakt mit Hasen	Mochmann (pers. Mitt. v. 1. 8. 60)
		3. Nordseeküste					
12	1957	in verschiedenen Orten der Halbinsel Eiderstedt (Land Schleswig-Holstein)	600—750	November/Dez.	7	Feldmäuse, Große Wühlmaus, Trinkwasser?	Knothe, Zimmermann u. Havemeister[42] Statist. Berichte[82]
13	1958	ebenda		Dez. 1957, Jan. bis Juni	31	Kontakt mit Hasen bei 18 Person. gesich.	
14	1958	Norderdithmarschen		Januar	1	Abhäuten eines Hasen aus Eiderstedt	
15	1959	in Hamburg		Dezember	1	Kontakt mit Hasen unbekannter Herk.	pers. Mitt. d. Gesundheitsbehörde Hamburg 6. 3. 61
16	1959	im Lande Schleswig-Holstein		April	1		Statit. Berichte[82]
	1960	Einzelfälle		Sept.	1		
		4. Stromgebiet des Mains, Mainfranken, Steigerwald					
17	1949/50	erster Fall in Strüth bei Röttingen	600	Winter			
18	1950	kleine Epidemie im Taubertal	600	Jan.-März	18	Hasen	Schürmann u. Reich[74] Schürmann u. Hüttner[73] Jusatz[36]

19	1950/52	erste Epidemie im westl. u. südl. Vorgelände des Steigerwaldes und im südl. Steigerwald	< 600	Herbst und Winter (1952:)	über 30 davon: 16 im Reg.Bez. Mittelfranken gemeldet	in 76% Kontakt mit Hasen, bei 1 Person mit Ratten, beim Abziehen eines Rehbocks (Zekken). Vermehrtes Vorkommen kranker Hasen	Launu. Donle[45] Sonnenschein (pers. Mitt. vom 3. 5. 53) Seiser (pers. Mitt. vom 30. 7. 52)
				(1952:)	29 im Reg.Bez. Unterfranken gemeldet		
20	1952	Streufälle in Dörfern des Kr. Aub, Rotenburg, Haßfurt, Neustadt a. Aisch u. Schweinfurt	< 600		6	starke Verbreitung von Zecken bei Scheinfeld im Steigerwald	Gross (pers. Mitt. vom 17. 10. 53)
21	1953	weitere Streufälle			5		Statist. Berichte[82]
22	1960	Frauental (Kreis Mergentheim)	600	Juli	1 Todesfall (51 j. Frau) (serologisch diagnostiziert)	vermutl. beim Heumachen auf einer Waldwiese, kein Kontakt mit Hasen (nur 12 km vom ersten Auftreten der Tularämie im Taubertal (Nr. 17) entfernt)	Bozenhardt (Brief v. 28. 3. 61)
		5. Einzelfälle in übrigen Teilen der Bundesrepublik					
	1950	Kreis Helmstedt	600			1 Hase	Harms u. Hörter[26]
	1950	Delstern (Gut Kuhweide) im Kreis Hagen (Westfalen)	750	Febr.		1 Hase patholog. diagnostiziert	Keller (pers. Mitt. vom 4. 8. 50)
	1950/51	Saarland			2	Infektion in Frankreich erworben	Becker (pers. Mitt. vom 22. 8. 51)
	1951	Heinebach (Kr. Melsungen)	600		1 Todesfall (64jähr. Frau)	Handverletzung beim Abbalgen eines Hasen	Starck[81]
	1951	Darmstadt	600	Febr.	1		Krey (pers. Mitt. vom 6. 4. 51)

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Nr.	Jahr	Landschaft	Durchschnittl. jährl. Niederschlagsmenge in mm	Jahreszeit	Anzahl der Fälle	Nagerart und Überträger	Erwähnt von
	1953	Gifhorn	600			1 Hase bakteriol. u. durch Tierversuch	Harms u. Hörter[26]
	1955	Riebelsdorf (Kr. Ziegenhain i. Hessen)	600	Dez.	1 (serolog. nachgewies.	nach Biß und Kratzen einer Katze	Krey (pers Mitt. vom 7. 4. 56)
	1957	Hessen: Darmstadt	600	April	1 Arztfrau	Infektionsquelle unbekannt	Krey (per. Mitt. vom 14. 2. 61)
	1958	Reg-Bez. Münster	700	Juni	2	unbekannt	Statist. Berichte[82]
	1958	Reg.-Bez. Hildesheim	600	Juli	1	unbekannt	Statist. Berichte[82]
	1958	Bayern: Reg.-Bez. Oberpfalz: Friedenfels (Kr. Tirschenreuth)	600	August	3	unbekannt	Wasöhrl (pers. Mitt. vom 22. 3. u. 6. 4. 61)
		6. Verbreitung durch Wildhandlungen in der Bundesrepublik Deutschland					
	1950/51	Frankfurt a. Main (Endemie in einer Wildhandl.)		Winter	8 3 Angestellte erkrankten im Jan. 1950, weitere 5 im Nov. 1950 bis Jan. 1951, weitere 3 von 54 Angestellt. serologisch positiv	Kontakt mit Hasen aus Importen, aber auch mit aus Deutschland bezogenen Hasen	Schiff[71]
	1950/51	Kiel: Epidemie durch 221 aus Eiderstedt gelieferte Hasen		Ende Dez. bis Anfang Jan.	30	Erreger aus 2 Hasen isoliert	Lenz[47]
	1951	Husum, Südtondern, Norderdithmarschen			9		Rabe u. Cruse[66] Knothe[41]

	1951	Hofheim (Main-Taunus-Kreis)		Januar	1	Genuß von Hasenfleisch aus Wildhandlung	KREY (per. Mitt. vom 6. 4. 51)
	1951/52	Köln (Endemie in einer Wildhandlung)		Okt./Jan.	4	Kontakt mit Hasen aus Deutschland (Eifel?) bezogen (wahrscheinlich auch aus Unterfranken?)	SCHULTEN u. PETRY[76] SCHULTEN[75]
	1952	Bonn (Endemie in einer Wildhandlung)		Jan.-Febr.	?	Kontakt mit Hasen aus Unterfranken bez.	SEELIGER (pers. Mitt.)
	1954	Heidelberg		Nov./Jan.	4	Hasen a. Uffelheim (Mainfr.)	PÖHLIG[63]
	1957/58	Berlin (sowjet. besetzter Sektor)		Dez./Jan.	2	Hase aus einer Wildhandlung	MOCHMANN[56]
				7. Tschechoslowakische Republik			
1	1957				29		BENDA-HEYBERGER[3] Epid. Vit. Stat. Rep. WHO *13*, 580 (1960)
2	1958				14		
				8. Österreich			
				a) Marchfeld			
1	1947/50	Einzelfälle im alten Epidemiegebiet (Bez. Mistelbach) in Niederösterreich (N.Ö.)	500		jährlich 7—16	Hasen	KRAUTER[43] PUNTIGAM[64,65]
2	1950	erneutes Aufflackern im Bez. Mistelbach, dazu in den Bezirken Horn, Zwettl u. Waidhofen a. d. Thaya	500—600		39 (in ganz Österreich 1950: 45 Fälle 1951: 26 Fälle gemeldet)		KRAUTER[43] PUNTIGAM[64,65]

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Nr.	Jahr	Landschaft	Durchschnittl. jährl. Niederschlagsmenge in mm	Jahreszeit	Anzahl der Fälle	Nagerart und Überträger	Erwähnt von
3	1953 und	erneutes Aufflackern im alten Nistgebiet	500—600		80 davon 62 in N.Ö.	Massenvermehr. der Feldmäuse	Puntigam[64,65]
4	1957	dazu in den Bezirken Gmünd, Melk, Tullen, Korneuburg sowie Einzelfälle auch südlich der Donau			67, davon 61 in N.Ö.	in N.Ö. 1950, 1953 1956, 1959,	Beran[4]
5	1959/60	überdurchschnittliche Häufung von Fällen im alten Herdgebiet	500	Winter	1959: 45 1960: 145 (I. Quartal)	Herbst 1959 i. Marchfeld Mäuesterben d. *P. multocida* 2 Kontakte mit Bisamratten	Bieling[7] Alamm, Kovac u. Loew[6] Krauter (per. Mitt. vom 7. 4. 60)
		b) Burgenland					
6	1950	Einzelerkrankung in Bruck a. d. Leitha	600		1		Puntigam[64,65]
7	1959/60	überdurchschnittliche Zahl von Erkrankungen im nördl. Burgenland, im Bezirk Bruck a. d. Leitha, im Seewinkel sowie in Nickelsdorf u. Tadten an der ungarischen Grenze	600	Herbst und Winter	1959: 8 1960 (I. Quart.): 69	enorme Vermehrung von Feldmäusen im Herbst nach 1959 langer Trockenperiode	Puntigam[64,65]
8	1959/60	Epidemischer Ausbruch unter den Arbeitern einer Zuckerfabrik in Bruck a. d. Leitha	600	Anfang bis Nov. 1959 Ende Januar 1960 1960	577 serol. gesicherte Erkrankungen (von 830 Männern u. 200 Frauen)	schwere Mäuseplage, Epizootie bei Hasen bis März 1960	Friza[22] Flamm u. Wiedermann[20] Puntigam[64,65]
						6 Hasen, 1 Ratte serol. positiv	Kress u. Scharfen[44]

IV. Westeuropa

a) Frankreich

1	1950	gemeldete Fälle			191 *Gemeinden:*		
2	1951	in 13 Departements erneut gehäuftes Auftreten	500—600	bis 31. Dez.	64		
3	1952	Ardennes, Aube, Eure et Loire, Finistère, Nièvre, Nord und Somme	700	bis 31. Dez.	367		Tierseuchenberichte[83]
4	1953	in den gleichen Gebieten		bis 31. Dez.	44		
5	1954	in den gleichen Gebieten		im Sommer	6		
6	1956	bes. die Departements Vienne, Indre	700	im Sommer	3		
	1957	Dordogne, Gard	>700	von Sept. bis Dez.	7		
	1958	Haute-Marne, Meurthe-Moselle, Oise, Somme	500—600 500—600	im Sommer	2	Hasen (Isolierung von *P. tularensis* in der Dordogne u. in Vienne)	G. Girard (pers. Mitt. vom 12. 4. 60)
	1959	Nièvre, Loir et Cher, Aube		bis 31. Juli	7		
7	1960	bes. die Dep. Oise, Somme, Pas de Calais, Indre	500—700	Winter bis Ende Febr.	43		Tierseuchenberichte[83]
8	1960	Dep. Oise	<500	April Sept.	62 43	bei 8 von 91 Hasen (Fallwild) Tul. nachgewies.	Nachrichtenblatt des Jagdrates Tierseuchenberichte[83]

b) Niederlande

9	1953	in Horn am Rhein (Kr. Roermond)		Jan.	7 (Familienerkrankung)	Genuß eines Hasen, wahrscheinlich aus Belgien	Hemmes[27]

c) Schweiz

10	1951	im Berner Jura (Gegend von St. Ursanne)		Juni		1 Stamm isoliert aus einem Hasen	Galli-Valerio[23]

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Nr.	Jahr	Landschaft	Durchschnittl. jährl. Niederschlagsmenge in mm	Jahreszeit	Anzahl der Fälle	Nagerart und Überträger	Erwähnt von
			V. Süd- und Südosteuropa				
			a) Italien				
1	1931	Provinz Rovigo	700			10 Hasen aus Ungarn import.	Bardelli u. Ravaglia[2], Bardelli[1],
2	1951	Calabrien	750		1	nach Hundebiß (serolog. und durch Kutanreaktion nachgewiesen)	Neri[58], Cinelli[11], Neri[58]
				b) Jugoslawien			
1	1946	Einzelfälle in Ljubljana			3		Žibert[89]
2	1952 bis 1956	in Kroatien in 5 Bezirken entlang der Save von Zagreb bis Nova Gradiška, bes. Dugo Selo, Sisak, Nouska	750	Jan.-März	45 meist Familieninfektionen	Kontakt mit 2 verseucht. Hasen. Epizootie (5280 Hasen aus and. Bezirken Kroatiens waren negativ)	Zaharija[87] Neri[58] Falisevac[18] Mihaljevic[51] Mihaljevic u. Falisevac[52]
	1953	in 2 Dörfern in der Nähe von Zagreb	750		14 (5 Stämme isol.)		Bezjak u. Mitarb.[58] Neri[58]
				c) Rumänien			
1	1948/49	Provinz Moldau u. an den Küstengebieten am Schwarzen Meer	400—500	Winter		Hausmaus, Feldmaus, Hamster (in 0,1%)	Cornelson u. Mitarb.[13,14]
2	1955	Erkrankungen von Hamsterjägern in einigen Dörfern von Siebenbürgen (Transsylvan.)	750	Jan. bis Juni	44 u. 3 positive Kutanreaktion	Hamster (in 92% d. Erkrankten), Hasenepizootie, Epizootie b. *Microtusarvalis*	Condrea u. Mitarb.[12]
				d) Ungarn			
	1954 bis 1958	Gruppenerkrankungen			~ 100	unbekannt	Epid. Vit. Stat. Rep. Who *13*, 580 (1960)

zusammenzustellen, die für die Beurteilung einer Gegend entscheidend sind, ob sie als potentielles Seuchengebiet für Tularämie angesprochen werden kann.

Bei einer globalen Betrachtung aller bisher beobachteten Tularämievorkommen auf der Erde (Jusatz[38] im: Welt-Seuchen-Atlas, Band III, Karte Nr. 88) fiel auf, daß die Tularämie bisher noch nie die Grenzen der holarktischen Tierregion überschritten hat. Offenbar scheint hier eine sehr alte Bindung zwischen dem Erreger und seinem ursprünglichen tierischen Reservoir als einem ausgesprochenen Vertreter der Holarktik zu bestehen.

Für die epidemiologische Lage in Mittel- und Westeuropa deutet der Ausbruch einer Epidemie der Tularämie mit vorwiegend thorakalen Formen bei den Arbeitern einer Zuckerfabrik in Bruck an der Leitha, die im Winter 1959/60 in einem Abstand von 11 Jahren nach den schweren epidemischen Ausbrüchen unter den Zuckerfabrikarbeitern in der Ukraine 1948/49 erfolgte, auf die Gefahr einer weiteren Verseuchung der Feldmauspopulationen hin. Es muß mit einer Massenverbreitung von *P. tularensis* jetzt auch hier gerechnet werden, wenn die geomedizinischen Bedingungen unter der Voraussetzung des Eintretens besonders günstiger klimatischer Verhältnisse auch in den bisher bekannten Nistgebieten der Tularämie in Mittel- und Westeuropa erfüllbar sind.

Die ökologische Betrachtungsweise mit dem Vergleich ähnlicher Situationen in den Vereinigten Staaten von Amerika läßt aber noch eine weitere Gefährdung erkennen, die auch in Europa auftreten kann, wenn nämlich in der Nähe enzootischer Herdgebiete der Erreger mit Hilfe eines lokal verbreiteten Überträgers (Zecken, Bremsen oder Stechmücken) auf Schafe übergehen kann. Hiermit muß nach den vorausgegangenen Darlegungen auch in Europa gerechnet werden. Dabei bedarf es für die Zeckenverbreitung keineswegs großer Areale, sondern es genügen vielmehr zur Übertragung des Erregers auf Schafe allein schon Aktionszentren an Waldrändern oder in Wegrainen, worauf Enigk[16] für den Übertragungsmodus der Schaf-Piroplasmose durch Zecken hingewiesen hat.

Zusammenfassung

1. Die Westwärtsbewegung der Tularämie in Europa ist in der Berichtszeit von 1950—1960 zu einem Stillstand gekommen.

2. In einigen der alten Nistgebiete der Tularämie sind wiederum in verschieden langen Abständen neue epizootisch-epidemische Ausbrüche erfolgt. Hierdurch wird angezeigt, daß die Tularämie nunmehr auch in Mittel- und Westeuropa zu einer autochthonen Seuche der heimischen

Nagerwelt geworden ist und von dieser auf den Menschen übergehen kann.

3. Die weitere Entwicklung der Tularämie in Europa wird gekennzeichnet durch die Erfüllung bestimmter geomedizinischer Bedingungen, von denen ein dauerndes Einnisten des Erregers in die heimische Fauna einiger klimatisch und ökologisch besonders ausgezeichneter Herdgebiete abhängig ist. Dabei muß damit gerechnet werden, daß auch die Feldmausbestände eines Nistgebietes bei Eintreten optimaler Klimaverhältnisse verseucht werden und die Infektion weitertragen können.

4. Eine synökologische Betrachtung zeigt, daß sich auch in Europa eine Verseuchung unter den Schafbeständen in Nistgebieten der Tularämie oder in ihrer Umgebung ereignen kann.

5. Mit dem weiteren Auftreten von Tularämie in epidemischer Form in Mittel- und Westeuropa muß auch künftig gerechnet werden. Jedes neue Vorkommen von Tularämiefällen in einem bisher noch unverseucht gebliebenen Gebiet bedarf einer genauen geomedizinischen Analyse, ob es in dem betreffenden Gebiete zu einer Ausbildung eines neuen Dauerherdes für Tularämie kommen kann.

Literatur

[1] Bardelli,: Bull. Off. int. Hyg. publ. **29**, 1905 (1937).

[2] Bardelli, et Ravaglia: Infezione nelle lepri di una riserva di caccia riferibile alla Tularämie. Ann. Igiene **41**, 776 (1931).

[3] Benda, A., u. K. Heyberger: Čsl. biol. **2**, 380 (1953).

[4] Beran: Disk. bem. Österr. Ges. f. Mikrobiol. Wien. klin. Wschr. **1960**, 825.

[5] Bezjak, B.: Tularemija u N. R. Hrvatskoj 1954. Rad. med. Fak. Zagrebu **3**, 173 (1955).

[6] Bieling, R.: Tularämie. Fiat Ref. German Sci. **68**, III, 150 (1948/49).

[7] Bieling, R.: Die thorakale Form der Tularämie. Wien. klin. Wschr. **1960**, 822.

[8] Björkman, et al.: Svenska Läk.-Tidn. **56**, 300 (1959).

[9] Borg, K., u. K. G. Nyström: Tularämie ater aktuell. Medlemsblad för Sveriges Veterinörförbund Nr. **16** (1960).

[10] Briceno Iragorry, L.: Pers. Mitteilung vom 7.7.1960.

[11] Cinelli, E.: Acad. med. Calabr. **67**, 191 (1952).

[12] Condrea, P., et al.: Epidémie de Tularémie de Type Professionnel Déterminée par le Cricetus-cricetus. Arch. roum. Path. exp. Microbiol. **18**, 175 (1959).

[13] Cornelson, D. A., et al.: Contributii la Studiul Tularémie. Bull. şti. Sec. Şti. med. (Bucureşti) **3**, 809 (1951).

[14] Cornelson, D. A.: Contributiuni la Cunoasterea Raspindirii in Moldova a Unor Mamifere Cu Rol Potential in Transmisiunea Tularemie. Inst. de Med. Iasi Buletinul Ses. Stint. **3**, 1281 (1956).

[15] Eicke, W.: Über Serienuntersuchungen auf Tularämie an 4420 Ratten. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **156**, 85 (1950).

[16] Enigk, K.: Das Auftreten der Schafpiroplasmose in Deutschland. Z. Tropenmed. Parasit. **4**, 175 (1953).

[17] Epidem. vital. Statist. Rep. WHO **13**, 580 (1960).

[18] Falisevac, J.: Vortrag Gesellschaft d. Ärzte. Wien 1957.

[19] Flamm, H., W. Kovac u. J. Loew: Epidemiologische Untersuchungen zur Infektion mit Pasteurellen im nordöstlichen Niederösterreich. Wien. med. Wschr. **1960**, 993.
[20] Flamm, H., u. G. Wiedermann: Zur Methodik der serologischen Tularämie-Diagnostik. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **180**, 254 (1960).
[21] Frank, F.: Inst. f. Grünlandschädlinge, Oldenburg. Pers. Mitteilung v. 4.6.1960.
[22] Friza, F.: Beobachtungen thorakaler Formen von Tularämie in Rußland. Wien. klin. Wschr. **1960**, 816.
[23] Galli-Valerio, B.: Observations sur l'agent spécifique de la Tularémie. Schweiz. med. Wschr. **1938**, 1206.
[24] Girard, G.: Aspects Épidémiologiques de la Tularémie en France. Presse méd. **57**, 968 (1949).
[25] Girard, G.: Pers. Mitteilung vom 22.9.1960.
[26] Harms, F., u. R. Hörter: Tularämie bei Hasen in Niedersachsen. Dtsch. Tierärztl. Wschr. **1953**, Nr. 37/38.
[27] Hemmes, G. D.: Tularämie te Horn. Ned. T. Geneesk. **97**, 990 (1953).
[28] Henninger: Tularaemie. Reichsgesundheitsbl. **1932**, 689.
[29] Henninger: Beobachtungen und Untersuchungen über Tularämie. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **140**, 105*, 114* (1937).
[30] Hueck, K.: Die natürliche Vegetation. Karte in N. Krebs, Atlas des deutschen Lebensraumes.
[31] Jung, H. D.: Die Tularämie als neue differentialdiagnostisch wichtige Erkrankung. Derm. Wschr. **1951**, 73.
[32] Jusatz, H. J.: Das Vordringen der Tularämie nach Mitteleuropa in der Gegenwart. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **122**, 352 (1939).
[33] Jusatz, H. J.: Zweiter Bericht über das Vordringen der Tularämie nach Mittel- und Westeuropa in der Gegenwart. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **134**, 350 (1952).
[34] Jusatz, H. J.: Die geogr.-med. Erforschung von Epidemien. Petermanns geogr. Mitt. **1940**, 201.
[35] Jusatz, H. J.: Tularämie in Europa 1926—1951. In: Welt-Seuchen-Atlas, Band I, S. I/31 (1952), Karte 14.
[36] Jusatz, H. J.: Das Tularämie-Vorkommen in Mainfranken 1949—1953. Arch. Hyg. (Berl.) **139**, 189 (1955).
[37] Jusatz, H. J.: Tularämie in Mitteleuropa 1933—1953. In: Welt-Seuchen-Atlas, Band II, S. II/37 (1956).
[38] Jusatz, H. J.: Die geogr. Verbreitung der Tularämie auf der Erde von 1911—1959 In: Welt-Seuchen-Atlas, Band III, S. III/35 (1961).
[39] Kacprzak, M.: Choroby Zakaźne Warszawa, T. II, 331 (1937).
[40] Kassur, B.: Tularemia. Odbitka z Polskiego Archiwum Medycyny Wewnetrznej Nr. 3/51. Warszawa 1951.
[41] Knothe, H.: Über die Epidemiologie der Tularämie. Beiträge zur Hygiene u. Epidemiologie, Heft 7. Leipzig 1955.
[42] Knothe, H., O. Zimmermann u. G. Havemeister: Über die Tularämie in Schleswig-Holstein. Dtsch. med. Wschr. **1959**, 906.
[43] Krauter, St.: Veränderungen der Klinik und der Immunitätslage bakterieller Infektionskrankheiten. Wien. med. Wschr. **1960**, 52.
[44] Kress, F., u. E. Scharfen: Frischblut-Farbschnelltest für die rasche Ermittlung der Tularämie. Wien. klin. Wschr. **1960**, 820.
[45] Laun, R. H., u. W. Donle: Über zwei ganz verschiedene Tularämie-Epidemien. Münch. med. Wschr. **1953**, 146.
[46] Legezynski: zit. nach [60].
[47] Lenz, W.: Tularämie in Schleswig-Holstein. Ärztl. Wschr. **1951**, 523.

[48] Lilleengen, K.: Svensk Vet. tidskr. **47**, 644 (1942).
[49] Lilleengen, K.: Svensk Jakt **80**, 547 (1942).
[50] Ljung, O.: Nord. Med. **60**, 1044 (1958).
[51] Mihaljevic, F,. et al.: Tularämie u N. R. Hrvatskoj. Higyijena **6**, 129 (1954).
[52] Mihaljevic, F., u. J. Falisevac: Communications Congrès National des Sciences Médicales, S. 671. Bukarest 1957.
[53] Mochmann, H.: Tularämie im Raume Mecklenburg. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **164**, 106 (1955).
[54] Mochmann, H.: Epidemiologische Betrachtungen über eine neue Gruppenerkrankung an Tularämie im Raume Mecklenburg. Münch. med. Wschr. **1957**, 1153.
[55] Mochmann, H.: Tularämie, eine aktuelle Anthropozoonose. Landarzt **1959**, 1157.
[56] Mochmann, H.: Tularämie-Infektion, ausgehend von einer Wildhandlung. Dtsch. Gesundh.-Wes. **1958**, 1532.
[57] Mochmann, H., u. H. J. Otte: Zur Diagnostik, Epidemiologie und Therapie der Tularämie im Raume Mecklenburg. Prophylaxe **2**, 97 (1955).
[58] Neri, W.: Aspetti Epidemiologici della Tularämie. Igiene mod. **49**, 1059 (1956).
[59] Olin, G.: The Occurrence and Mode of Transmission of Tularämie in Sweden. Acta path. microbiol. scand. **19**, 220 (1942).
[60] Parnas, J., et T. Dombrowski: Travaux complexes sur les foyers naturels de tularémie, de leptospirose et de quelques autres anthropozoonoses en Pologne. Arch. Inst. Pasteur Tunis **34**, 351 (1957).
[61] Parnas, J., T. Rozowski u. F. Wysocka: Tularemia. Warszawa 1957.
[62] Peltier, M., et al.: Tularémie in Afrique occidentale? Bull. Acad. Méd. (Paris) **121**, 562 (1939).
[63] Pöhlig, W.: Wildversand als Ursache menschlicher Tularämie-Erkrankungen. Öff. Gesundh.-Dienst **17**, 295 (1955).
[64] Puntigam, F.: Thorakale Formen im Seuchengeschehen der Tularämie in Österreich. Wien. klin. Wschr. **1960**, 813.
[65] Puntigam, F.: Erkrankungen an thorakalen Formen der Tularämie bei Arbeitnehmern in Zuckerfabriken. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 162 (1960).
[66] Rabe, H. H., u. C. Cruse: Die Tularämie, eine beachtenswerte Infektionskrankheit im westdeutschen Raum. Med. Welt **1951**, 933.
[67] Rimpau, W.: Leptospirosen. In: Welt-Seuchen-Atlas, Band I, S. 51. Hamburg 1952.
[68] Rozowski, T.: Ann. Univ. Lublin-Polonia, Sec. D **10**, 261 (1955).
[69] Rozowski, T.: Presse méd. **64**, 608 (1956).
[70] Russ, J., u. H. Brieger: Über eine familiäre Erkrankung an Tularämie. Kinderärztl. Praxis **19**, 161 (1951).
[71] Schiff, W.: Beitrag zum derzeitigen Vorkommen der Tularämie in Deutschland. Med. Mschr. **6**, 103 (1952).
[72] Schoop, G.: Tularämie auch im Wartheland. Dtsch. tierärztl. Wschr. **1942**, 81.
[73] Schürmann, H., u. R. Hüttner: Tularämie in Deutschland. Klin. Wschr. **1950**, 758.
[74] Schürmann, H., u. H. Reich: Arch. Derm. Syph. (Berl.) **190**, 576 (1950).
[75] Schulten, H.: Tularämie in Westdeutschland. Münch. med. Wschr. **1952**, 2555.
[76] Schulten, H., u. A. Petry: Tularämie in Westdeutschland. Medizinische **1952**, 813.
[77] Shdanow, V. M.: Immunization in communicable disease control. Eröffnungsansprache Techn. Discussions WHO 13. Assembly, Genf 3.5.1960. Public Health Papers No 8, S. 8 (1961).

[78] Shmuter, M. F.: Über Erkrankungen an Tularämie in Zuckerfabriken. J. Microbiol. Epid. Imm. **30**, No 3, 46 (1959).
[79] Simm, K.: Przegl. lek. **5**, 465 (1949); ref. Excerpta med. (Amst.), Sect. IV **3**, 250 (1950).
[80] Skrodzki, E.: Przegl. epidem. **8**, 149, 173 (1954).
[81] Starck, H. J.: Sektionsbefunde bei Tularämie nach lympho-hämatogener Generalisation. Zbl. allg. Path. path. Anat. **89**, 233 (1952).
[82] Statistische Berichte, Statist. Bundesamt Wiesbaden 1952—1960.
[83] Tierseuchen-Bericht, Bundesmin. f. Ernährung, Landwirtschaft u. Forsten. Bonn 1952—1960.
[84] Tischler, W.: Synökologie der Landtiere. Stuttgart 1955.
[85] Unger, L.: Eine Gruppenerkrankung an Tularämie. Med. Klin. **49**, 471 (1954).
[86] Verge, J.: Les maladies communes àl'Homme et aux Animaux: la Tularémie. Rec. Méd. vét. **114**, Nr. 2 (1938).
[87] Zaharija, I.: Zdrav. novine, Zagreb **6**, 115 (1953).
[88] Zembrzuski, K.: Przegl. epidem. **8**, 31, 193 (1954).
[89] Žibert: zit. nach [5] und [52].

Professor Dr. H. J. Jusatz,
Hygiene-Institut der Universität, Heidelberg, Thibautstraße 2

Zeitschrift f. Hygiene 148, 94—104 (1961)

Aus dem Pathologisch-Bakteriologischen Institut des Kantonsspitals Luzern
(Vorsteher: PD. Dr. M. Aufdermaur)

Harnstoff-Extrakte aus gramnegativen Bakterien in der indirekten Hämagglutinationsreaktion

I. Mitteilung:

Harnstoff-Extrakte aus S. typhi, paratyphi-B, cholerae suis und Shig. sonnei

Von
H. Brodhage

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 6. Juli 1961)

Harnstoffextrakte aus Bakterien sind von verschiedenen Autoren beschrieben worden. So isolierte z. B. Walker mit einer 2,5 m wäßrigen Harnstofflösung toxische und immunisierende Fraktionen aus S. typhi und typhimurium. Iland stellte durch Einwirkung von kristallinem Harnstoff auf Tuberkelbakterien eine Vaccine her, deren Wirksamkeit umstritten ist (Aufdermaur u. Brodhage). Toda bekam aus Tuberkelbakterien durch Extraktion mit festem Harnstoff Proteinfraktionen, die sich serologisch in der Präcipitation als wenig wirksam erwiesen. Angeregt durch die Arbeiten von Neter u. Mitarb. über die enterobakterielle, indirekte Hämagglutinationsreaktion interessierte es uns, die Wirkung von Harnstoffextrakten aus gramnegativen Bakterien (Salmonellen und Shig. sonnei) mit Hilfe dieser Reaktion zu studieren.

Versuchsanordnung

A. Herstellung der Bakterienharnstoffextrakte (UE)

1. Rouxschalen werden mit den entsprechenden Bakterien beimpft und nach 24 stündigem Bebrüten bei 37° mit 5 ml Hämagglutinationspufferlösung-DIFCO (HA-Puffer) abgeschwemmt.

2. Versetzen der Bakteriensuspension mit kristallinem Harnstoff, und zwar 5 g Urea pro Bakterienmenge einer Rouxschale. Unter gelegentlichem Schütteln verbleibt das Urea-Bakteriengemisch 72 Std bei 37° im Brutschrank.

3. Nach Anlage von Sterilitätsproben filtrieren durch Papierfilter.

4. 48 Std dialysieren gegen gepufferte NaCl-Lösung (p_H 7,0).

5. Nach der Dialyse wird der Extrakt verdünnt: pro Rouxschale-Ausgangsmaterial mit 30 ml HA-Puffer.

6. Abfüllen in Röhrchen à 5 ml. Aufbewahrung im Tiefkühler bei −20°.

B. Herstellung der formalinisierten Hammelerythrocyten

Wir wählten zur Herstellung der form. Hammelerythrocyten die Methode Weinbach.

1. Von frischen, dreimal ausgewaschenen Hammelerythrocyten (HE) wird eine 8%ige Aufschwemmung in phys. NaCl hergestellt. Zu 1 Vol. dieser HE-Aufschwemmung gibt man 1 Vol. der Formalinlösung (siehe unten) und läßt dieses Gemisch 18—20 Std im Brutschrank stehen. Anschließend wird das überschüssige Formalin durch drei- bis viermaliges Auswaschen mit Aqua bidestillata entfernt und von dem Sediment eine 10%ige Aufschwemmung in doppeltdestilliertem Wasser hergestellt.

2. *Formalinlösung.* Titriertes und mit 1 n NaOH gegen Phenolphthalein (nach Sörensen) neutralisiertes Formalin wird mit phys. NaCl-Lösung auf 3% verdünnt.

C. Technik der indirekten Hämagglutinationsreaktion (HAR)

1. Die zu testenden Sera werden 1:1 mit HA-Pufferlösung verdünnt, inaktiviert und mit normalen Hammelerythrocyten (HE) absorbiert.

2. Sensibilisierung der Hammelerythrocyten (HE): 5 ml Urea-Extrakt (UE) werden mit 0,1 ml frischen oder formalinisierten HE versetzt und 2 Std bei 37° inkubiert. Nach dreimaligem Auswaschen mit HA-Pufferlösung wird das Sediment schließlich in 25 ml HA-Pufferlösung resuspendiert. Sensibilisierte, form. HE sind längere Zeit im Kühlschrank haltbar, sens. frische HE dagegen nur einige Tage.

3. Ausführung der Hämagglutinationsreaktion (HAR): in 0,3 ml HA-Pufferlösung wird eine doppelte Verdünnungsreihe des Serums angelegt. 0,3 ml der sens. HE (frische oder form.) in jedes Röhrchen zugeben, 2 Std bei 37° inkubieren, aufschütteln und über Nacht bei Zimmertemperatur stehenlassen. Als Titer wird die Verdünnung des Serums angegeben, in der noch deutlich mit bloßem Auge eine Agglutination zu erkennen ist.

Werden frische Hammelerythrocyten verwendet, dann kann zusätzlich noch die Hämolyse angeschlossen werden (Zufügen von Meerschweinchenkomplement in jedes Röhrchen).

D. Hemmtest

1. Doppelte Verdünnungsreihe des Antigens in 0,3 ml HA-Pufferlösung.

2. Zugabe von 0,3 ml des verdünnten Kaninchen-Immunserums in jedes Röhrchen (Serumverdünnung = 4 HA-Einheiten. 1 HA-Einheit = die Serumverdünnung, die gerade noch eine deutliche Hämagglutination ergibt).

3. 1 Std bei 37° inkubieren.

4. In jedes Röhrchen 0,3 ml sensibilisierte HE-Suspension einfüllen.

5. 2 Std bei 37° — aufschütteln — über Nacht bei Zimmertemperatur stehenlassen — ablesen.

6. Kontrollen: a) Serum (4 HA-Einheiten) + sens. HE; b) Serum + Antigen + norm. HE; c) Serum + Norm. HE; d) Sens. HE + HA-Pufferlösung.

Untersuchungsergebnisse

Um einen Überblick von der Wirksamkeit der Harnstoff-behandelten Bakterien (UE) in der indirekten Hämagglutinationsreaktion (HAR) zu erhalten, testeten wir zuerst einige der handelsüblichen Salmonella- und Shigellatestsera. In Tab. 1 sind die Resultate dieser Versuche zusammengestellt. Die Salmonella-O-Testsera reagieren mit den homologen UE

Tabelle 1. *Indirekte HAR mit handelsüblichen Salmonella- und Shigella-Testsera*

Anti-Serum	Form. HE, sensibilisiert mit Urea-Extraktien aus			
	S. typhi	S. paratyphi-B	S. cholerae suis	Shig. sonnei
V_i	3200++*	negativ	negativ	800
O: 1, 4, 5, 12	negativ	400	negativ	negativ
O: 6, 7, 8	negativ	negativ	3200	negativ
O: 9, 12	negativ	negativ	negativ	negativ
Shig. flexneri polyvalent	negativ	negativ	negativ	negativ
Shig. shig.	negativ	negativ	negativ	negativ
Shig. sonnei	800	800	200	1600++
H: b	negativ	negativ	negativ	negativ
H: c	negativ	negativ	negativ	negativ
H: d	negativ	negativ	negativ	negativ
H: 1, 2, 3, 5	negativ	negativ	negativ	negativ

* Die Zahlen in den Tabellen bedeuten die reziproken Werte der HA-Titer.

bzw. das Anti-Vi und nicht das Anti-O-Serum 9,12 mit dem S. typhi-UE. Die Kreuzreaktion des Anti-Vi-Serums mit dem Shig. sonnei-UE ist ebenso überraschend wie die positive Reaktion des Anti-Shig.-sonnei-Serums mit den geprüften UE. Für einen weiteren Versuch wählten wir Widal-positive Sera der „Typhusstation" sowie Sera von gesunden Personen. In Tab. 2 sind einige der Resultate zusammengefaßt. Die indirekte HAR mit UE sensibilisierten Hammelerythrocyten (HE) ergibt durchschnittlich höhere Titer als die gewöhnliche Agglutinationsreaktion und erscheint dazu noch empfindlicher zu sein. Ganz unerwartet sind die Kreuzreaktionen, die sich nicht ohne weiteres durch Zusammenhänge innerhalb der O-Antigene der einzelnen Erreger erklären lassen. Bei gesunden Personen lassen sich keine Hämagglutinine nachweisen.

In einer dritten Versuchsreihe sollte die Bildung von Antikörpern (Hämagglutinine) im Kaninchen bei intravenöser Injektion von Harnstoff-behandelten Bakterien nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck

Tabelle 2. *Widal-positive Sera der Untersuchungsstation und Sera von gesunden Personen in der indirekten HAR*

Serum	Widal	Frische bzw. formalinisierte HE, sensibilisiert mit Urea-Extrakten aus					Bemerkungen
		S. typhi	S. paratyphi-B	S. cholerae suis	S. typhi murium	Shig. sonnei	
605/58	S. parat. B: 50+ S. typhi mur. 50±	HA: 320+++ HL: 320+++	320+++ 320+++		320 320+++		Stuhl: S. typhi murium
2773/57	S. parat. B: 200±	320 320	1280 1280		S. chester: HA: 640 HL: 1280		Stuhl: S. paratyphi-B
695/58	negativ	80 320+++	160 320+++		320 320+++		Sektion: Enteritis catarrh.
3127/57	S. enteritidis 800+	320+++ 320+++	5120 2560		S. chester: HA: 5120 HL: 2560		Stuhl: S. enteritidis
2204/58	S. typhi: 100+	20 640	1280 1280			640 neg.	Blut: S. typhi
				Formalinisierte HE			
2222/58	S. typhi: 200+	320	320	80	320		Blut: S. typhi
2278/59	S. typhi: 800+	2560	320		320		Blut: S. typhi
881/59	negativ	320	40	80	80		Stuhl: S. cholerae suis
2008/60	S. newport: 50+	320	80	1280		320	Stuhl: S. newport
2168/59	S. typhi mur. 100±	320	320	320	320	160	Stuhl: S. typhi murium
2276/59	S. parat. B: 800±	20	2560	2560	2560		Stuhl: nicht untersucht
2289/59	S. typhi mur. 25± S. parat. B: 50±	40	320	320	320		Stuhl: nicht untersucht
2324/59	negativ	40	320	320	320		Galle: Sityphi
789/59	negativ	neg.	neg.		neg.		gesund
1467/59 1427/59 1635/59 1642/59	negativ	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	gesund

wurde den Tieren (Gewicht ca. 3 kg) in Abständen von 3—5 Tagen: 0,5—0,5—1,0—1,0—1,0—1,0—1,0 ml Ureaextrakt (ca. 5 mg Trockensubstanz/ml) i.v. injiziert. 7 Monate nach der letzten Injektion erfolgte mit 1,0 ml UE eine „booster-injection". Vor Beginn des Versuches und dann in gewissen Zeitabständen wurde den Tieren aus der Ohrvene Blut für die indirekte HAR entnommen. In der Abb. 1 sind die Resultate mit dem S. paratyphi-B/UE-Immunserum aufgezeichnet. Auf die Darstellung der Ergebnisse mit den übrigen Immunsera (S. typhi, cholerae suis und Shig. sonnei) kann wegen der Ähnlichkeit verzichtet werden.

Bei fast allen Versuchstieren fanden wir einen schwachen, unspezifischen Anfangstiter, der zwischen 1:10 und 1:80 schwankt. 4 Tage nach

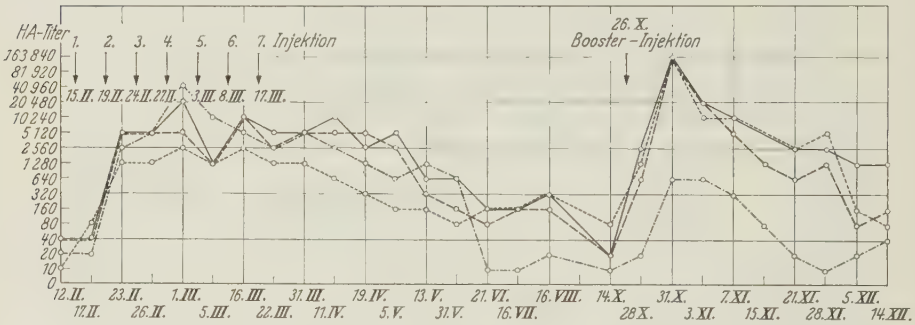


Abb. 1. S. paratyphi-B/Urea-Extrakt-Kaninchen-Immunserum
Formalinisierte HE, sensibilisiert mit Urea-Extrakten aus: S. typhi ——; S. paratyphi-B ——; S. cholerae suis · — ·; Shig. sonnei - - - -

der zweiten Injektion sind die HA-Titer bereits stark angestiegen, und zwar nicht nur gegen den homologen UE, sondern auch gegenüber den übrigen UE-Antigenen. Die hohen Titer bleiben ca. 3 Monate bestehen, um dann im Verlaufe von weiteren 4 Monaten langsam abzufallen. Nach der „booster-injection" erfolgt ein steiler Anstieg auf sehr hohe Werte.

Auf Grund der beobachteten Kreuzreaktionen erschien es angebracht, die verschiedenen Kaninchenimmunsera in der indirekten HAR mit Hammelerythrocyten (HE) zu testen, die mit einem bekannten Antigen sensibilisiert wurden. Durch das freundliche Entgegenkommen von Dr. Lüderitz[1] stand uns für verschiedene Versuche das LP

[1] Herrn Prof. O. Westphal und Herrn Dr. O. Lüderitz (Dr. A. Wander-Forschungsinstitut, Freiburg) sei auch an dieser Stelle herzlich für die große Hilfe und Unterstützung gedankt.

(Lipopolysaccharid) aus S. abortus equi zur Verfügung. In Tab. 3 sind Vergleichsversuche mit dem S. abortus equi-LP und S. paratyphi-B/UE aufgeführt.

Mit diesem und dem nachfolgenden Versuch sollte bewiesen werden, daß die Kreuzreaktionen nicht auf dem Vorhandensein von unspezifischen Antikörpern gegen den Harnstoff beruhen.

Der übliche S. cholerae suis-UE wurde lyophilisiert und anschließend nochmals dialysiert (Dr. Lüderitz). 1,75 g lyophilisierter UE ergaben nach der Dialyse 270 mg. Wie die Tab. 3 und 4 zeigen, ergeben auch die mit dem LP (S. abortus equi) sowie dem lyophilisierten S. cholerae suis-UE sensibilisierten HE deutliche Kreuzreaktionen.

Tabelle 3. *Vergleichsuntersuchungen an Kaninchen-UE-Immunsera mit form. HE, sensibilisiert mit S. abortus equi-LP und S. paratyphi-B/UE*

Urea-Extrakt-Antiserum vom 3. 11. 1960	Form. HE, sensibilisiert mit	
	S. abortus equi LP 1248 NaOH	Urea-Extrakt S. paratyphi-B
S. typhi	320	640
S. paratyphi-B	5120	40960
S. cholerae suis	2560	2560
Shig. sonnei	640	5120

Tabelle 4. *Wirkung der Lyophilisierung und weiteren Dialyse des S. cholerae suis-UE auf die Kreuzreaktionen mit den verschiedenen UE-Antisera*

UE-Antiserum vom 3. 11. 60	S. cholerae suis UE	S. cholerae suis UE[1] 2 mg/5 ml
S. typhi	320	640
S. paratyphi	640	640
S. cholerae suis	10240	20480
Shig. sonnei	2560	320

[1] Salm. cholerae suis-UE lyophilisiert und nochmals dialysiert.

Schließlich überprüften wir das Verhalten der Urea-Extrakte und vergleichsweise das S. abortus equi-LP im Hemmtest. Aus der Tab. 5 ist ersichtlich, daß bei einem S. paratyphi-B/UE-Immunserum das LP aus S. abortus equi als Antigen nur die Hämagglutination (HA) gegen die mit dem homologen LP beladenen HE hemmt, während die HA mit den UE sensibilisierten HE nicht gehemmt wird. Andererseits hemmen die beiden UE als Antigen die HA in allen drei Fällen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß in dem S. paratyphi-B/UE-Immunserum mehrere Antikörper (Hämagglutinine) vorhanden sind, die in ihrem Verhalten verschieden zu sein scheinen.

Da der Harnstoff zu der Gruppe der sogenannten Wasserstoffbrückensprenger gehört (Zillig u. Mitarb.), war es ganz interessant, auch noch andere Substanzen dieser Gruppe zu untersuchen[1]. Für diesen Versuch stellten wir uns die verschiedenen Extrakte (Thioharnstoff, Kaliumrhodanid, Guanidin, Formamid, Calciumchlorid und Magnesium-

[1] Herrn Dr. A. Aebi (Fa. Ed. Geistlich Söhne AG., Wolhusen, Schweiz) sei auch an dieser Stelle für seine hilfreiche Diskussion und Unterstützung bestens gedankt.

perchlorat) aus S. cholerae suis-Bakterien her. Die Methode der Herstellung wie auch die Sensibilisierung der HE war die gleiche wie bei den Harnstoffextrakten. Auch die Sterilitätsproben nach Einwirkung

Tabelle 5. *Das Verhalten von S. abortus equi-LP, paratyphi-B/UE, Shig. sonnei/UE und S. paratyphi-B/UE-Kaninchen-Immunserum im Hemmtest*

Antigenverdünnung	Antigen S. abortus equi LP			Antigen S. paratyphi-B UE			Antigen Shig. sonnei UE		
	1*	2	3	1	2	3	1	2	3
1: 2	—	++	++	—	—	—	—	—	—
4	—	++	++	—	—	—	—	—	—
8	—	++	++	—	—	—	—	—	—
16	—	++	++	—	—	—	—	—	—
32	—	++	++	—	—	—	—	—	—
64	—	++	++	—	—	—	—	—	—
128	±	++	++	—	—	—	—	—	—
256	+ +	++	++	—	+	—	—	—	—
512	+++	++	++	—	++	+	—	—	±
Serum + sensibil. HE	+++	+++	+++						
Serum + Antigen + norm. HE	—			—			—		
sens. HE + HA-Puffer	—	—	—						
Serum + norm. HE	—								

* Form. HE sensibilisiert mit: 1 S. abortus equi-LP, 2 S. paratyphi-B-UE, 3 Shig. sonnei-UE.

Tabelle 6. *Verhalten der verschiedenen S. cholerae suis-Bakterienextrakte (hergestellt mit Substanzen aus der Gruppe der Wasserstoffbrückensprenger) in der indirekten HAR*

Urea-Extrakt-Antiserum	Form. HE, sensibilisiert mit verschiedenen Extrakten aus S. cholerae suis						
	Urea	Thioharnstoff	Kaliumrhodanid	Guanidin	Formamid	Calciumchlorid	Magnesiumperchlorat
S. typhi	160	160	640	80±	160	80±	80
S. paratyphi-B	640	20480	160	20480	80	80	80
S. cholerae suis	10240	2560	20480	10240	10240	80	80
Shig. sonnei	1280	10240	5120	5120	1280	1280	1280

der verschiedenen Substanzen waren in allen Fällen negativ. Wie aus der Tab. 6 hervorgeht, sind vier der getesteten Substanzen (Thioharnstoff, Kaliumrhodanid, Guanidin und Formamid) in ihrer Wirkung dem Harnstoff ähnlich und ergeben zum Teil sogar höhere HA-Titer.

Diskussion

Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß sich frische und formalinisierte Hammelerythrocyten (HE) gut mit Harnstoffextrakten (UE) aus S. typhi, paratyphi-B, cholerae suis und Shig. sonnei sensibilisieren lassen. Dabei haben die form. HE den Vorteil, über längere Zeit für die indirekte Hämagglutinationsreaktion (HAR) verwendbar zu sein.

Die Prüfung handelsüblicher Salmonellatestsera (O und H) sowie des Shig sonnei-Testserums ergibt eine Hämagglutination (HA) zwischen den Anti-O-Sera und den mit dem homologen UE sensibilisierten HE (bzw. Anti-Vi-Serum und S. typhi-UE). Die HAR mit den entsprechenden H-Testsera ist negativ. Auffallend ist das Verhalten des Shig. sonnei-Testserums gegenüber den Salmonellen-UE (Tab. 1). Eine ähnliche Beobachtung konnten auch Neter u. Mitarb. machen. Sie fanden in dem Serum eines Patienten mit einer Shig. sonnei-Infektion Hämagglutinine gegen S. muenchen-oregon, cholerae suis und S. paratyphi-B.

Die HAR mit UE beladenen Hammelerythrocyten und humanen, Widal-positiven Sera der „Typhusstation" ergibt Kreuzreaktionen, die sich nicht ohne weiteres mit den in den Bakterien vorhandenen O-Antigenen in Verbindung bringen lassen. Werden Kaninchen mit UE aus S. typhi, paratyphi-B, cholerae suis und Shig. sonnei immunisiert, so bilden sich Antikörper (Hämagglutinine), die nicht nur mit dem homologen UE, sondern in gleichem Umfang auch mit den übrigen UE reagieren (siehe Abb. 1). Diese starken Kreuzreaktionen lassen sich ebenfalls nicht mit den betreffenden O-Antigenen in Verbindung bringen. Es bestehen zwar gewisse Beziehungen zwischen den einzelnen Salmonellen-O-Antigenen, wie aus der Arbeit von Kampelmacher hervorgeht. Der Titer gegenüber den heterologen O-Antigenen ist aber stets niedriger und beruht meistens noch auf der Gemeinsamkeit einzelner O-Antigenfaktoren. Bei den von uns verwendeten Stämmen haben wohl S. typhi und S. paratyphi-B den Faktor 12 gemeinsam, jedoch hat die S. cholerae suis weder mit der S. typhi noch mit S. paratyphi-B einen gemeinsamen O-Faktor. Man wäre daher versucht, den Harnstoff, der in gewissem Umfang noch in den Bakterienextrakten enthalten ist, für die Kreuzreaktionen verantwortlich zu machen. Um diese Frage weiter abzuklären, wurden die UE-Antisera mit S. abortus equi-LP (Tab. 3) sowie mit einem lyophilisierten und weiter dialysierten S. cholerae suis-UE vergleichsweise getestet (Tab. 4). Aus beiden Experimenten geht hervor, daß die Kreuzreaktionen bei dieser Versuchsanordnung nicht verschwinden und daher wohl auch nicht mit dem Harnstoffgehalt der Antigene erklärbar sind. Ebenso sprechen die Kreuzreaktionen bei den Widal-positiven humanen Sera gegen diese Auffassung. Ähnliche Kreuzreaktionen konnte auch Gillissen unter Verwendung von Extrakten aus mechanisch aufgeschlossenen Salmonellen beobachten.

Im Hemmtest (Tab. 5) ist das LP aus S. abortus equi als Antigen in der Lage, die homologen, nicht aber die heterologen Hämagglutinine zu binden. Dagegen binden die UE aus S. paratyphi-B und Shig. sonnei als Antigen sowohl die homologen als auch die heterologen Hämagglutinine (incl. derjenigen gegen S. abortus equi-LP). Das heißt, daß die UE (S. paratyphi-B und Shig. sonnei) als Antigen im Kaninchen die Bildung von Antikörpern (Hämagglutinine) bewirken, die gegen die homologen und heterologen UE-Antigene wie auch gegen das LP aus S. abortus equi gerichtet sind.

Auf Grund der Versuchsergebnisse müßte demnach angenommen werden, daß durch die Harnstoffbehandlung der von uns verwendeten Bakterien ein diesen Bakterien gemeinsames Antigen zur Wirkung kommt, für das wir die Bezeichnung „C-Antigen" (common antigen) vorschlagen möchten. Das „C-Antigen" scheint serologisch eine gewisse Beziehung zum O-Antigen aufzuweisen (Tab. 1). Die Existenz des „C-Antigens" wäre auch eine Erklärung für die Kreuzreaktionen, die wir bei der Testung der Widal-positiven humanen Sera beobachtet haben.

Wir müssen uns vorstellen, daß unter der Einwirkung von gewissen körpereigenen Abwehrkräften des Makroorganismus das eindringende *lebende* Bacterium verändert und aufgespalten wird. Während dieses Vorganges wird unter anderem auch das „C-Antigen" freigelegt, kann so zur Wirkung kommen und die Bildung von „C-Antikörpern" (Hämagglutinine) hervorrufen. Diese lassen sich durch geeignete serologische Reaktionen nachweisen. Die indirekte HAR ist nach unseren Erfahrungen eine dieser Reaktionen.

Die Wirkung des Harnstoffes auf Proteine wird hauptsächlich darauf zurückgeführt, daß ein Aufbrechen der Wasserstoffbindungen erfolgt mit anschließender Entfaltung der vorher bestehenden Schraubenstruktur (McCrea und Loughlin; Neurath u. Mitarb.). Es zählt deshalb der Harnstoff zu den sogenannten Wasserstoffbrückensprengern (Zillig u. Mitarb.). Von den anderen Substanzen dieser Gruppe, die wir untersucht haben (Tab. 6), zeigen den gleichen Effekt wie Harnstoff: Thioharnstoff, Kaliumrhodanid, Guanidin, Formamid und in bedeutend weniger starkem Umfang Calciumchlorid und Magnesiumperchlorat. Bei allen diesen Substanzen erfolgt dabei auch eine Abtötung der Bakterien. Kaliumperchlorat sowie Natriumchlorid zeigen dagegen keine Wirkung auf die Bakterien, selbst in sehr hohen Konzentrationen nicht.

Auf Grund der erlangten Resultate (serologische Beziehung zu O-Antigenen sowie Harnstoffwirkung auf Proteine) möchten wir darauf schließen, daß das „C-Antigen" aus Protein und Lipopolysaccharid besteht.

Bei folgenden Bakterien haben wir im Verlaufe unserer Versuche Beobachtungen machen können, die auf das Vorhandensein eines

„C-Antigens" schließen lassen: S. typhi, paratyphi-B, typhi murium, chester, cholerae suis und Shig. sonnei. Weitere Untersuchungen sind im Gange und sollen demnächst publiziert werden.

Zusammenfassung

Mit den Harnstoffextrakten (UE) aus S. typhi, paratyphi-B, cholerae suis und Shig. sonnei lassen sich frische und formalinisierte Hammelerythrocyten (HE) leicht sensibilisieren. Diese zeigen in der indirekten Hämagglutinationsreaktion (HAR) starke Kreuzreaktionen bei der Testung von humanen, Widal-positiven Sera der Untersuchungsstation sowie von Kaninchen-UE-Immunsera. Es wird auf Grund der Versuchsergebnisse die Vermutung geäußert, ein besonderes Antigen, bestehend aus Protein und Lipopolysaccharid, könnte die Erklärung für die Kreuzreaktionen sein. Für dieses Antigen wird die Bezeichnung „C-Antigen" (common antigen) vorgeschlagen. Als Arbeitshypothese wird angenommen, daß im Wirtsorganismus durch körpereigene Abwehrkräfte aus den *lebenden* Bakterien das „C-Antigen" freigesetzt wird.

Harnstoff ist in der Lage, die Wasserstoffbindungen der Proteine aufzubrechen. Er gehört daher zur Gruppe der sogenannten Wasserstoffbrückensprenger. Auch mit anderen Substanzen dieser Gruppe lassen sich Bakterienextrakte herstellen, die Hammelerythrocyten sensibilisieren und in einem ähnlichen Umfang wie die Harnstoffextrakte Kreuzreaktionen ergeben.

Für die exakte Durchführung der Versuche sei auch an dieser Stelle Fräulein Lore Theile herzlich gedankt.

Literatur

Aufdermaur, M., u. H. Brodhage: Tierexperimentelle Untersuchungen mit BCG und Harnstoff vorbehandelten Tuberkelbazillen. Schweiz. Z. Path. **21**, 1237 bis 1243 (1955).

Gillissen, G.: Die immunologische Antwort auf Salmonella-Extrakte. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 105 (1961).

Iland, C. N.: Immunising properties of a urea-killed tubercle vaccine. Lancet **1**, 277 (1953).

Kampelmacher, E. H.: On antigenic O-relationships between the groups Salmonella, Arizona, Escherichia and Shigella. Antonie v. Leeuwenhoek **25**, 289—324 (1959).

McCrea, J. F., and J. O'Loughlin: Effect of concentrated urea solutions on the infectivity and haemagglutinin of vaccinia virus. Nature (Lond.) **184**, 1497—1498 (1959).

Neter, E., O. Westphal, O. Lüderitz and E. A. Gorzynski: The bacterial hemagglutination test for the demonstration of antibodies to enterobacteriaceae. Ann. N. Y. Acad. Sci. **66**, 141—156 (1956).

Neter, E., E. A. Gorzynski, R. M. Gino, O. Westphal and O. Lüderitz: The enterobacterial hemagglutination test and its diagnostic potentialities. Canad. J. Microbiol. **2**, 232—244 (1956).

Neurath, H., and A. M. Sauer: J. biol. Chem. **128**, 347 (1939); zit. nach H. Schmidt: Fortschritte der Serologie, 2. Aufl. Darmstadt: Steinkopff 1955.

Toda, Y.: On the isolation of serologically active proteins from the tubercle bacillus. Ann. Tuberc. (Tenri) **7**, 1—13 (1956).

Walker, J.: A method for the isolation of toxic and immunizing fractions from bacteria of the Salmonella group. Biochem. J. **34**, 325—329 (1940).

Weinbach, R.: Die Verwendbarkeit formolbehandelter Erythrocyten als Antigenträger in der indirekten Haemagglutination. Schweiz. Z. Path. **21**, 1043—1052 (1958).

Westphal, O., u. O. Lüderitz: Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. Angew. Chem. **66**, 407—417 (1954).

Zillig, W., W. Krone u. M. Albers: Untersuchungen zur Biosynthese der Proteine. III. Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung und Struktur der Ribosomen. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **317**, 131—143 (1959).

Dr. H. Brodhage,
Pathologisch-Bakteriologisches Institut, Kantonsspital Luzern (Schweiz)

Zeitschrift f. Hygiene 148, 105—114 (1961)

Aus dem Hygiene-Institut der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
(ehem. Direktor: Prof. Dr. H. Kliewe)

Die immunologische Antwort auf Salmonella-Extrakte

Von
G. Gillissen

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Juli 1961)

Das Kauffmann-White-Schema hat seinen gesicherten Platz in der Diagnostik der Antigen (Ag)-Struktur. Die Ag-Formel ist aber — wie Kauffmann selbst wiederholt sagte — nur in Verbindung mit der von ihm angegebenen Immunisierungsmethode zu sehen. Da die Zahl antigenwirksamer Substanzen in einer Bakterienzelle sehr wahrscheinlich größer sein dürfte als die Zahl der für die Diagnostik verwendeten determinanten Gruppen (Kauffmann; Westphal u. Mitarb.) oder Strukturen (Staub) in der Zellwand, wurde untersucht, ob sich durch eine mechanische Aufschließung der Bakterienzelle Stoffe freisetzen lassen, die sich als Ag von den im Kauffmann-White-Schema angegebenen Ag unterscheiden und unter Umständen eine Beziehung zwischen Salmonellen aufweisen, die nach diesem Schema keine serologische Gemeinsamkeit besitzen[1]. Diese Frage lag um so näher, als Cooper u. Pillow bei Shigellen im Cytoplasma außer dem immunologisch aktiven somatischen Ag ein weiteres, nicht näher charakterisiertes Ag nachwiesen.

Material und Methoden

Verwendet wurden die Salmonellenstämme typhi murium (Breslau) (1,4,5—i), newport (6,8—e,h), uganda (3,10—1,z^{13}) und paratyphi A (1,2,12—a).

Die *Herstellung von Vaccinen* erfolgte durch Abschwemmen von 18—20 Std alten Agarkulturen mit je 5 ml phys. NaCl-Lösung (Zusatz von 0,5% Phenol). Nach Weiterverdünnen von 1 T. Keimsuspension mit 3 T. Phenol-NaCl-Lösung wurde 30 min auf 56° C erwärmt, eine Sterilitätsprüfung durchgeführt, die N_2-Konzentration aller Vaccinen und der unten beschriebenen Extrakte nach Bestimmung in Conway-Kammern auf 0,224 mg N_2/ml eingestellt und die Agglutinabilität der Vaccinen mit O-Seren geprüft (Tab. 1).

Zur *Extraktherstellung* wurden in derselben Weise Keimsuspensionen ohne Phenolzusatz hergestellt, mit Aceton bis zur zwei Drittelsättigung versetzt, 24 Std im Eisschrank gehalten und dann 20 min bei 3800 U/min zentrifugiert. Das Keimsediment, welches mit O-Seren die typische Agglutination ergab, wurde mit phys. NaCl aufgenommen und mit dem von uns früher angegebenen Gerät (Gillissen, Graubner u. Fleck) unter Verwendung von Quarzstaub homogenisiert. Das

[1] Herrn Professor Westphal sei für Diskussion und Hinweise bei der Bearbeitung dieser Frage herzlich gedankt.

Homogenat wurde dann 30 min bei 3800 U/min und der Überstand nochmals 20 min bei 22500 U/min zentrifugiert. Der völlig klare, gelbliche Überstand wurde nach Einstellung auf 0,224 mg N_2/ml bis zum Gebrauch in der Tiefkühltruhe (— 20° C) aufbewahrt (Qu—E).

Zur Gewinnung von *Immunseren* benutzten wir männliche Kaninchen von 3 kg. Diese erhielten in Abständen von je einer Woche 0,5—1,0—1,5 und 2,0 ml (im zuletzt beschriebenen Versuch 0,5—0,5—1,0—1,0) Vaccine bzw. Extrakt sc. appliziert. Eine Woche danach wurde das Serum gewonnen.

Tabelle 1. *Kontrolle der Teststämme (Vaccinen) auf Agglutinabilität*

Vaccine	Testseren (O—AK)				
	1,4,5	6,8	3,10	1,2,12	NaCl
S. typhi murium	+	O	O	—	O
S. uganda	O	O	+	O	O
S. newport	O	+	O	O	O
S. paratyphi	O	O	O	+	O

Zeichenerklärung: O keine Agglutination; + positive Agglutination; — nicht geprüft.

Die *Absättigung der Seren* erfolgte in üblicher Weise nach Castellani. Die gewaschenen Keime von 24 Std alten Agarkulturen (Petri-Schalen) wurden mit 5 ml 1 : 25 verdünntem Serum aufgenommen, 2 Std bei 37° C und 20 Std bei Zimmertemperatur belassen und dann abzentrifugiert. 9 T. des abgesättigten Serums wurden mit 1 T. 2,5%iger Phenol-phys. NaCl-Lösung versetzt.

Für die *Hämagglutination* (Neter, Gorzynski, Gino, Westphal u. Lüderitz sowie Neter, Westphal, Lüderitz u. Gorzynki) wurden dreimal in m/15 Phosphatpuffer p_H 7,3 gewaschene Hammelerythrocyten benutzt. Zur Sensibilisierung wurden die gereinigten Lipopolysaccharide[1] (LP) O_{111} und abortus equi, die mit NaOH aktiviert waren (Lüderitz, Westphal, Eichenberger u. Neter), sowie LP-Hitzeextrakte aus S. newport, S. uganda, S. typhi murium, S. paratyphi A und E. coli O_{111} benutzt. Die LP-Hitzeextrakte wurden durch 60 min langes Erhitzen der Keimsuspensionen (m/15 Phosphatpuffer p_H 7,3) im kochenden Wasserbad und anschließendem Abzentrifugieren der Keime hergestellt (Braun, Lüderitz, Schäfer u. Westphal).

Die *Sensibilisierung der Erytrocyten* erfolgte in Gegenwart von LP-Hitzeextrakt 1 : 5 bzw. einer LP-Konzentration von 50 μg LP/ml sowie einer Erythrocytenkonzentration von 2,5% (30 min 37° C). Die erneut gewaschenen Erythrocyten wurden mit dem Phosphatpuffer bis zu einer Erythrocytenkonzentration von 2,5% aufgenommen. 0,2 ml dieser Suspension wurde mit 0,2 ml Serumverdünnung aufgenommen und der Hämagglutinationstiter nach 30 min bei 37° C und 60 min Zimmertemperatur abgelesen.

Die Prüfung der *Immunpräcipitation* erfolgte in Capillaren und im Ouchterlony-Test. Im letzteren Falle wurden die Salmonella-Extrakte und die Extraktseren unverdünnt und LP in der sehr hohen Konzentration von 4 mg/ml aufgegeben.

Ferner untersuchten wir das Verhalten von Stämmen, die in Gegenwart des homologen Immunserums gezüchtet worden waren. Die Seren wurden durch Immunisierung von Kaninchen (siehe oben) mit Vaccinen aus S. paratyphi A, S. newport und S. uganda gewonnen (Ergebnisse siehe Tab. 2) und mit 0,5% Phenol versetzt.

[1] Die LP wurden liebenswürdigerweise von Herrn Professor Westphal und Herrn Dr. Lüderitz zur Verfügung gestellt.

Aus Tab. 2 ist zu entnehmen, daß Kreuzagglutinationen nicht auftraten. Diese Immunseren wurden im Verhältnis 1 : 10 einer Bouillon zugegeben (Phenolendkonzentration = 0,05%) und die homologen Keime in täglichen Passagen darin gezüchtet (Kontrolle: Bouillon mit entsprechendem Zusatz an phys. NaCl und Phenol). Vorversuche ergaben keine störende Beeinträchtigung des Keimwachstums. Von jeder Passage wurden Subkulturen auf die Nährböden nach Kligler und Endo, in Pb-Azetat-Agar und in Lactose- und Saccharose-Bouillon angelegt.

Tabelle 2. *Reziproke O-Agglutinations-Titer der Immunseren (hergestellt mit Keimvaccinen)*

Testkeim	Immunseren gegen		
	S. paratyphi A	S. newport	S. uganda
S. paratyphi A	1600	O	O
S. newport	O	400 + (800 ±)	O
S. uganda	O	O	800 + (1600 ±)

S. paratyphi-A-Bakterien wuchsen nach 43 Passagen als homogene Trübung und zeigten mit homologen Seren keine Agglutination. Dies war auch der Fall bei Keimen der ersten Subkultur auf serumfreiem Agar. Die NaCl-Kontrolle agglutinierte dagegen typisch. S. newport zeigte dasselbe Ergebnis nach 45 Passagen und S. uganda nach 62 Passagen. Der Verlust der charakteristischen Agglutinabilität wurde bei anderen Salmonellen schon früher beschrieben (Gillissen, Heusel u. Franco), wobei auf das Zustandekommen dieser Erscheinung in diesem Rahmen nicht eingegangen werden soll.

Der Zusammenhang dieser inagglutinablen Stämme mit dem Ausgangsstamm bzw. der Ausschluß einer akzidentellen Kontamination ließ sich dadurch demonstrieren, daß das biochemische Verhalten der Stämme gleichblieb. Darüber hinaus wurde durch Weiterzüchtung der Stämme in AK-freier Serumbouillon bzw. auf Blutagar die charakteristische Agglutinabilität wieder gewonnen. Dazu waren bei S. paratyphi A 22 Passagen, bei S. newport 25 und bei S. uganda 19 Passagen erforderlich.

Mit den so gewonnenen inagglutinablen Stämmen wurden — wie oben beschrieben — Vaccinen hergestellt und damit Kaninchen immunisiert. Die Seren wurden dann gegen die homologen Stämme und gegen die normalen, nicht vorbehandelten Stämme ausgetestet.

In einem letzten Versuch erhielten Kaninchen täglich 0,1 ml des Ugandaextrakts i.v. Der Temperaturverlauf wurde durch Messungen in Intervallen von 30 min verfolgt. Nach 19 Injektionen wurde 0,1 ml Newportextrakt injiziert, um festzustellen, ob eine auftretende Pyrogentoleranz (Beeson 1947; Farr, Clark, Proffitt u. Campbell sowie Göing) auch gegen den zweiten Extrakt wirkt.

Ergebnisse

1. Die Prüfung der mit Salmonella-Extrakt hergestellten Seren ergab das in Tab. 3 wiedergegebene Resultat.

Aus Tab. 3 ist zu entnehmen, daß die mit Salmonella-Extrakt hergestellten Immunseren vor allem eine Kreuzreaktion mit S. newport und S. uganda aufweisen. Dies ist weitaus weniger ausgeprägt mit S. paratyphi A und S. typhi murium.

2. Absorbiert man die beiden Salmonella-Extraktseren jeweils mit den homologen sowie mit den heterologen intakten Bakterien und

agglutiniert diese absorbierten Seren aus, dann ist festzustellen, daß durch die Absorption jeweils nur der entsprechende Faktor aus dem Serum entfernt wird (Tab. 4).

Beispielsweise wird aus einem Serum, das durch Injektion von Salmonella newport-Extrakt gewonnen wurde und mit S. newport und S. uganda kreuzagglutinierte, die Agglutinabilität für den homologen

Tabelle 3. *Reziproker Widaltiter der mit Extrakt (Qu—E) hergestellten Immunseren* (1. Serumverdünnung = 1 : 25)

Testkeim	Immunseren	
	Uganda-Extrakt	Newport-Extrakt
S. paratyphi A	50 ±	< 25
S. typhi murium	50 + (800 ±)	50 ±
S. newport	800 + (3200 ±)	800 + (1600 ±)
S. uganda	3200 + (6400 ±)	200 + (800 ±)

Anmerkung: Ablesung nach 2 Std bei 37° C und 20 Std Zimmertemperatur.

Tabelle 4. *Reziproke Widaltiter nach Absorption der Salmonella-Extraktseren*

Salmonella-Extraktserum (Qu—E)	Testbakterien			
	S. newport	S. uganda	S. typhi murium	Serum-Kontrolle
Newport-Serum [Newport-Bakt.]	O (< 10)	320 + (640 ±)	O (< 10)	O
Newport-Serum [Uganda-Bakt.]	80 + (60 ±)	O (< 10)	20 + (40 ±)	O
Newport-Serum [Parat. A-Bakt.]	80 + (320 ±)	320 + (640 ±)	10 + (20 ±)	O
Uganda-Serum [Newport-Bakt.]	O (< 10)	1280 + (2560 ±)	O (< 10)	O
Uganda-Serum [Uganda-Bakt.]	320 + (640 ±)	(40 ±)	O (< 10)	O
Uganda-Serum [Parat. A-Bakt.]	160 + (320 ±)	1280 + (2560 ±)	(160 ±)	O

Anmerkung: [ ] = Keime, mit denen die Seren absorbiert wurden. Ablesung der Titer nach 2 Std 37° C und 20 Std Zimmertemperatur; Serumverdünnung im ersten Röhrchen = 1 : 10.

Newport-Stamm durch Absorption mit Newport-Bakterien entfernt, während die heterologe Agglutinabilität für Uganda-Bakterien bestehen bleibt.

3. Mit der Hämagglutination wurde die Reagibilität der mit Extrakten (Qu—E) aus S. newport und S. uganda hergestellten Immunseren mit homologen und heterologen LP geprüft (Tab. 5).

Aus Tab. 5 geht hervor, daß die beiden Extraktseren mit LP (Rohextrakte) aus S. newport und S. uganda Kreuzagglutinationen geben. Auch mit gereinigtem LP-O_{111} und LP-S. abortus equi sowie LP

Tabelle 5. *Reziproker Hämagglutinationstiter mit Salmonellen-Extraktseren*

Sensibilisierendes Agens	Extraktseren (Qu—E)	
	S. uganda	S. newport
S. newport-Hitzeextrakt (LP)	64	512
S. uganda-Hitzeextrakt (LP)	> 2048	1024 + (2048 ±)
S. typhi murium-Hitzeextrakt (LP)	32	32
S. paratyphi A-Hitzeextrakt (LP)	4 + (8 ±)	4
E. coli-O_{111}-Hitzeextrakt (LP)	8	16
Gereinigtes LP-O_{111}	16	16 + (32 ±)
Gereinigtes LP-S. abortus equi	8	8 + (16 ±)

Anmerkung: Ablesung der Resultate nach 30 min 37° C und 60 min Zimmertemperatur.

Tabelle 6. *Immunpräcipitation mit S. newport-Extrakt*

Immunserum	Verd. (reziprok)	Reziproker Verdünnungsgrad des Newportextrakts (Qu—E)									
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Newport-Extraktserum	1	+	+	+	+	+	+	+	O	O	O
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	±	O
	4	+	+	+	+	+	O	O	O	O	O
	8	+	+	+	+	±	O	O	O	O	O
	16	+	+	+	?	O	O	O	O	O	O
	32	O	O	+	?	O	O	O	O	O	O
Uganda-Extraktserum	1	+	+	+	+	+	O	O	O	O	O
	2	+	+	+	±	O	O	O	O	O	O
	4	+	+	+	±	O	O	O	O	O	O
	8	O	±	O	O	O	O	O	O	O	O
	16	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Tabelle 7. *Immunpräcipitation mit S. uganda-Extrakt*

Immunserum	Verd. (reziprok)	Reziproker Verdünnungsgrad des Ugandaextrakts (Qu E)						
		1	2	4	8	16	32	64
Uganda-Extraktserum	1	+	+	+	+	+	O	O
	2	+	+	+	+	+	O	O
	4	+	+	+	+	±	O	O
	8	+	+	+	+	±	O	O
	16	+	+	+	+	+	O	O
	32	O	O	O	O	O	O	O
Newport-Extraktserum	1	+	+	+	+	+	O	O
	2	+	+	+	+	+	O	O
	4	+	+	+	+	+	O	O
	8	O	±	+	+	+	±	O
	16	O	O	O	O	O	O	O

(Rohextrakt) aus S. typhi murium sind — wenn auch in bedeutend geringerem Maße — Titer zu verzeichnen.

4. Die Präcipitation in Capillaren ergab das in Tab. 6 und 7 wiedergegebene Resultat.

Aus Tab. 6 und 7 ist zu entnehmen, daß die beiden Extraktseren auch mit jeweils beiden Salmonellenextrakten in der Capillarpräcipitation über Kreuz reagieren.

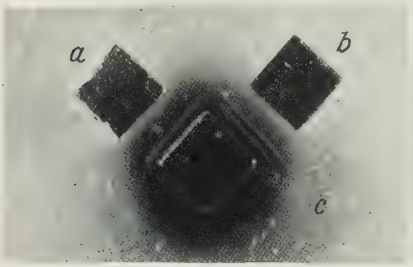


Abb. 1. *a* Uganda-Extrakt; *b* Newport-Extrakt; *c* Newport-Serum

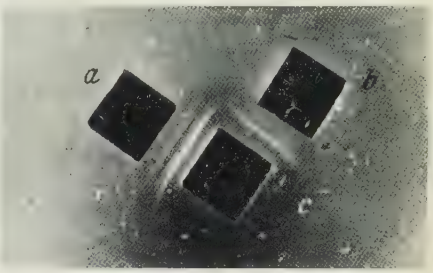


Abb. 2. *a* Uganda-Extrakt; *b* Newport-Extrakt; *c* Uganda-Serum

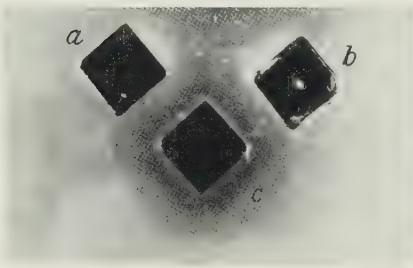


Abb. 3. *a* LP—O_{111}; *b* LP—ab. equi; *c* Uganda-Serum

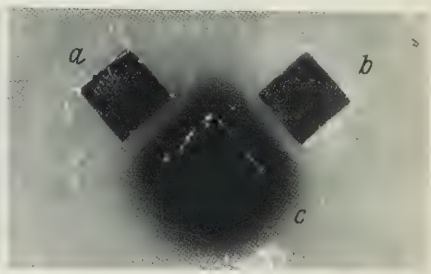


Abb. 4. *a* LP—O_{111}; *b* LP—Ab. equi; *c* Newport-Serum

5. Im *Ouchterlony-Test* gibt das Newport- und Uganda-Extraktserum mit dem homologen Extrakt zwei bzw. drei Banden und mit dem heterologen Extrakt jeweils eine Bande (Abb. 1 und 2). Während das Uganda-Extraktserum (Qu—E) gegen LP-O_{111} und LP-abortus equi keine deutliche Bande gab (Abb. 3), war mit Newport-Extraktserum (Qu—E) gegen beide LP eine Präcipitationslinie zu beobachten (Abb. 4). Bei einer quantitativen Abstufung des Ag waren mit Newport-Extraktserum analog gegen Newport-Extrakt (Qu—E) zwei Banden und gegen Uganda-Extrakt (Qu—E) eine Bande festzustellen (Abb. 5).

6. Die Versuche mit dem Pyrogen-Test (Abb. 6 und 7) ergaben sehr deutlich, daß nach 19maliger Injektion von Newportextrakt (Qu—E)

die Fieberreaktion zurückging, wenn auch eine völlige Pyrogentoleranz nicht auftrat. Dies entspricht den Beobachtungen von Eichenberger, Schmidthanser-Kopp, Hurni, Fricsay u. Westphal. Eine nachfolgende Injektion von Uganda-Extrakt führte zu keiner wesentlichen Änderung der Pyrogenreaktion. Das gleiche war der Fall, wenn man nach ebenso

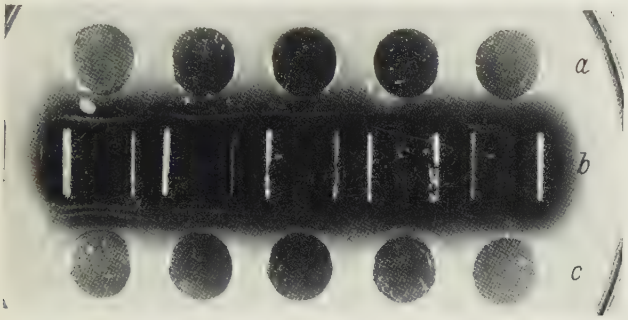


Abb. 5. *a* Uganda-Extrakt >; *b* Newport-Serum =; *c* Newport-Extrakt >

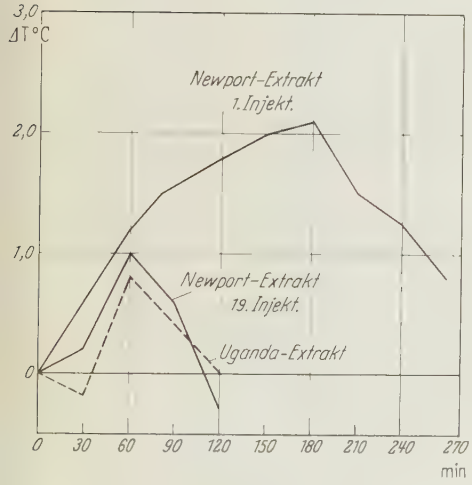


Abb. 6

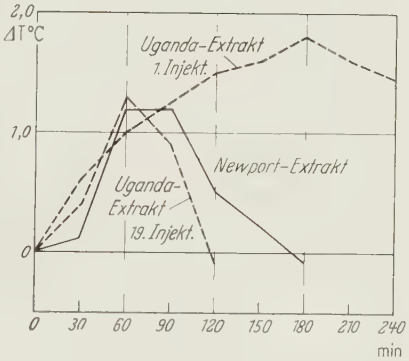


Abb. 7

Abb. 6. Fieberreaktion nach Injektion von Newport-Extrakt mit nachfolgender Injektion von Uganda-Extrakt

Abb. 7. Fieberreaktion nach Injektion von Uganda-Extrakt mit nachfolgender Injektion von Newport-Extrakt

häufiger Verabreichung von Ugandaextrakt (Qu—E) eine Injektion von Newport-Extrakt (Qu—E) anschloß. Die Toleranz gegen pyrogene Stoffe ist (Westphal) nicht gleichzusetzen mit einer Immunitätsreaktion. Man nimmt eine gewisse Kreuzreaktion gegen Pyrogene an (Farr, Clark, Proffitt u. Campbell), zumal diese Toleranz auch mit Typhusvaccine

Tabelle 8. *Versuche mit Keimen nach Vorzüchtung in homologen AK-Seren und den damit hergestellten Immunseren*
(Reziproke Agglutinationstiter)

Testkeim	Serum aus normaler Vaccine			Serum mit Keimen aus Serumpassagen		
	S. parat. A	S. newp.	S. uganda	S. parat. A	S. newp.	S. uganda
S. parat. A-unbehandelt	320 + (640 ±)	0	0	0	0	0
S. newport-unbehandelt	0	320 + (640 ±)	0	0	0	0
S. uganda-unbehandelt	0	0	1280 + (2560 ±)	0	0	80 + (160 +)
S. parat. A-Serumpassage	0*	0*	0*	80	0	0*
S. newport-Serumpassage	0	0	0	0	20 + (40 ±)	0
S. uganda-Serumpassage	0*	0*	0*	0*	0*	160 + (320 ±)

Anmerkung: Ablesung der Resultate nach 2 Std bei 37° C und 18 Std Zimmertemperatur. Serumverdünnung im ersten Röhrchen = 1 : 20. * = kein Agglutinationstiter feststellbar, sehr feinförmige Agglutination auch in der NaCl-Kontrolle.

gegen Viren ausgelöst werden kann (Atkins u. Cheng Huang). Es kann aber gesagt werden, daß die beiden Extrakte sich in ihrer pyrogenen Auswirkung auf den Makroorganismus nicht unterscheiden.

7. Die Versuche mit Keimen nach Passagezüchtung im homologen Immunserum, die zusammen mit Lahr durchgeführt wurden, ergaben das in Tab. 8 wiedergegebene Resultat.

Aus Tab. 8 ist zu entnehmen, daß die im homologen AK-Serum über Passagen vorbehandelten Keime nur im homologen AK-Serum agglutinieren. Eine gewisse Ausnahme stellt S. uganda (nicht vorbehandelt) dar. Das mit dem vorbehandelten Stamm gewonnene Serum agglutinierte sowohl die homologen, vorbehandelten Keime als auch die normalen Keime, erstere aber ausgeprägter als letztere.

Durch die Vorbehandlung im homologen AK-Serum verloren die Keime ihre charakteristische Agglutinabilität. Die damit hergestellten Immunseren verhielten sich demnach auch anders als die, welche in üblicher Weise mit normalen Keimen (Vaccine) gewonnen wurden. Im Gegensatz zu Extraktseren tritt aber keine Kreuzreaktion auf. Das Ergebnis mit S. uganda ist vergleichbar mit einer früher beschriebenen Beobachtung mit S. typhi (Gillissen, Heusel u. Franco).

Diskussion

Immunseren, die mit wäßrigen Auszügen aus mechanisch aufgeschlossenen Salmonellen hergestellt wurden, zeigten mit verschiedenen

Methoden deutliche Kreuzreaktionen mit den entsprechenden intakten Keimen, die sich nach dem Kauffmann-White-Schema völlig unterschieden. Dies legt die Annahme nahe, daß nach einer mechanischen Aufschließung von Salmonellen mit Hilfe von Quarz in einem wäßrigen Extrakt ein sehr wirksames Antigen darstellbar ist. Es ist sicherlich noch nicht möglich, alle Ergebnisse mit einer Theorie befriedigend zu erklären. Die Resultate dürften aber unter Umständen geeignet sein, zu einer Erklärung mancher anderer Beobachtungen wie der Toleranzphänomene beizutragen.

Zusammenfassung

Bei Verwendung von Extrakten aus mechanisch aufgeschlossenen Salmonellen erhält man Immunseren, die mit morphologisch intakten, sich nach dem Kauffmann-White-Schema völlig unterscheidenden Keimen ausgeprägte Kreuzreaktionen geben. Dies wurde demonstriert mit der Widalreaktion, der Hämagglutination, der Capillarpräcipitation und dem Ouchterlony-Test. Absorptionsversuche weisen auf das Vorliegen gemeinsamer Faktoren hin.

Literatur

Atkins, E., and W. Cheng Huang: Studies on the pathogenesis of fever with influenzal viruses. III. The relation of tolerance to the production of endogenous pyrogens. J. exp. Med. **107**, 415 (1958).

Beeson, T. B.: Tolerance to bacterial pyrogens. I. Factors influencing its development. J. exp. Med. **86**, 29 (1947).

Braun, O. H., O. Lüderitz, E. Schäfer u. O. Westphal: Serologische Eigenschaften von Lipopolysacchariden aus Dyspepsiecoli. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **142**, 522 (1956).

Brodhage, H.: Harnstoff-Extrakte aus gramnegativen Bakterien in der indirekten Hämagglutinationsreaktion. 1. Mitteilung: Harnstoff-Extrakte aus S. typhi, paratyphi-B, cholerae suis und Shig. sonnei. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 94 (1961).

Conway, E. J., and A. Byrne: An absorption apparatus for the microdetermination of certain volatile substances. Biochem. J. **27**, 419 (1933).

Conway, E. J., and A. Byrne: An absorption apparatus for the microdetermination of certain volatile substances. Biochem. J. **27**, 419 (1933).

Conway, E. J., and E. O'Malley: Microdiffusion methods. Ammonia and Urea using buffered absorbents (Revised methods for ranges greater than 10 μ g N). Biochem. J. **36**, 655 (1942).

Cooper, G. N., and J. A. Pillow: An immunological comparison of cell components of Shigella dysenteriae type 2. J. Immunol. **84**, 135 (1960).

Eichenberger, E., M. Schmidthanser-Kopp, H. Hurni, M. Fricsay u. O. Westphal: Biologische Wirkungen eines hochgereinigten Pyrogens (Lipopolysaccharids) aus Salmonella abortus equi. Schweiz. med. Wschr. **85**, 1190, 1213 (1955).

Farr, R. S., S. L. Clark jr., J. E. Proffitt and D. H. Campbell: Some humoral aspects of the development of tolerance to bacterial pyrogens in rabbits. Amer. J. Physiol. **177**, 269 (1954).

Gillissen, G., E. Heusel u. M. Franco: Das serologische Verhalten von Typhusbakterien nach Beeinflussung von Immunseren. Arch. Hyg. (Berl.) **138**, 408 (1954).

Gillissen, G., A. Graubner u. W. Fleck: Die Gewinnung von Zellinhaltsstoffen aus Mikroorganismen auf mechanischem Wege. Biochem. Z. **331**, 435 (1959).

Göing, H.: Die Wirkungsweise von Pyrogenen und bakteriellen Endotoxinen. Klin. Wschr. **21**, 1069 (1960).

Kauffmann, F.: Zur Serologie der somatischen Enterobacteriaceae-Antigene. 20. Jahresvers. d. Schweiz. Mikrobiol. Ges. Bern 17./18.6.1961.

Lüderitz, O., O. Westphal, E. Eichenberger u. E. Neter: Über die Komplexbildung von bakteriellen Lipopolysacchariden mit Proteinen und Lipoiden. Biochem. Z. **330**, 21 (1958).

Lüderitz, O., O. Westphal, K. Sievers, E. Kröger, E. Neter u. O. H. Braun: Über die Fixation von P^{34}-markiertem Lipopolysaccharid (Endotoxin) aus E. coli an menschliche Erythrocyten. Biochem. Z. **330**, 34 (1958).

Neter, E., E. A. Gorzynski, R. M. Gino, O. Westphal and O. Lüderitz: The enterobacterial hemagglutination test and its diagnostic potentialities. Canad. J. Microbiol. **2**, 232 (1956).

Neter, E., O. Westphal, O. Lüderitz and E. A. Gorzynski: The bacterial hemagglutination test for the demonstration of antibodies to Enterobacteriaceae. Ann. N.Y. Acad. Sci. **66**, 141 (1956).

Ouchterlony, O.: Diffusion in Gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy **5**, 1 (1958).

Staub, A. M.: Constitution chimique de certains sites présents à la surface des Entérobacteriaceae, responsables de leur spécifité vis-à-vis des anticorps et des bactériophages. 20. Jahresvers. d. Schweiz. Mikrobiol. Ges. Bern 17./18.6.1961.

Westphal, O.: Hochgereinigte Reizstoffe und Prinzipien ihrer Wirkungsanalyse. Verh. d. deutsch. Ges. für innere Medizin. 62. Kongr. 1956 in Wiesbaden.

Westphal, O.: Über Chemie und Biologie der O-Antigene. 20. Jahresvers. d. Schweiz. Mikrobiol. Ges. Bern 17./18.6.1961.

Westphal, O., u. O. Lüderitz: Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. Angew. Chem. **13/14**, 407 (1954).

Professor Dr. med. Dr. rer. nat. G. Gillissen,
Institut für medizinische Mikrobiologie (Direktor: Professor Dr. P. Klein) der Universität in Mainz

Zeitschrift f. Hygiene 148, 115—122 (1961)

Aus dem Bernhard Nocht-Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten, Hamburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. G. Nauck
Abteilung für Veterinärmedizin (Leiter: Priv.-Doz. Dr. R. Schindler)

Das Verhalten von Brucellen und verschiedenen anderen Bakterienarten in sauerstoffreichen bzw. -armen Bouillon-Kulturen*

Von
U. Reusse

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Juni 1961)

Bei Isolierungen pathogener Bakterien aus Mensch oder Tier auf festen Nährböden wird gewöhnlich nur ein Kolonietyp gefunden, der die vollvirulente Ausgangsform der betreffenden Bakterienart darstellt. Wegen seiner kreisrunden Form und seiner glatten und mehr oder weniger glänzenden Oberfläche wird dieser Kolonietyp seit Arkwright (1920) als S-Kolonie bezeichnet, wobei „S" die Abkürzung für smooth = glatt, weich ist. Werden solche frischisolierten Bakterien im Laboratorium über mehrere Passagen weitergezüchtet, so treten plötzlich Mutationen auf, die an einer veränderten Koloniemorphologie erkennbar sind. Die Kultur ist nun dissoziiert. Sie enthält außer den beschriebenen S-Kolonien jetzt auch I- (= intermediär)-, R- (= rough, rauh)- oder M- (= mucoid) Kolonien (Reusse 1958).

Eine Dissoziation zur Nicht-S-Form tritt in flüssigen, stationären Kulturen in stärkerem Maße auf als auf festen Nährböden. Die mutierten Bakterien besitzen im flüssigen Medium offenbar einen Wachstumsvorteil (positive Selektion) gegenüber den S-Zellen und reichern sich deshalb schnell an, bis schließlich die gesamte Kultur nur noch aus dissoziierten Bakterien besteht.

Werden dagegen flüssige Kulturen während der Bebrütung geschüttelt oder wird durch die Kulturflüssigkeit Luft oder Sauerstoff geleitet, so bleibt die Dissoziation aus (Gerhardt u. Gee 1946; Glassman u. Elberg 1946; Sanders u. Huddleson 1950, 1956; Braun u. a. 1956). Sauerstoff hat also offenbar einen Einfluß auf die Dissoziation. In den im folgenden beschriebenen Versuchen sollte seine Wirkung näher analysiert werden.

* Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden mit dem Brucella abortus-Stamm 2308 durchgeführt, und zwar sowohl mit dem S-Zell-Typ als auch mit R-, M_1- bzw. PS-Formen. (Nomenklatur nach Henderson 1952). Außerdem wurde je ein Stamm folgender Bakterienspecies in diese Untersuchungen einbezogen: Salmonella paratyphi B, Salmonella dublin, Escherichia coli, Brucella bronchiseptica, Pasteurella pseudotuberculosis, Listeria monocytogenes, Erysipelothrix muriseptica und Bac. anthracis. Als Nährboden kommen ich Basto-Trypton-Agar bzw. -Bouillon. (Nur bei Milzbrand wurde Herzinfusionsagar mit Serumzusatz verwendet und in CO_2-Atmosphäre bebrütet.)

In den ersten Versuchsreihen wurden Unterschiede in der Sauerstoffspannung bei sonst identischen Kulturbedingungen (250 ml Bouillon in 500 ml-Steilbrustflaschen) folgendermaßen erreicht:

1. Einleitung von Sauerstoff durch Berkefeld-Kerzen in die Kulturflüssigkeit.
2. Stationäre Bebrütung in Luftatmosphäre und
3. Herstellung eines angenäherten Vakuums durch Einstellen der Kulturgefäße in einen unvollständig evakuierten Zeissler-Topf (das angenäherte Vakuum wurde täglich zweimal erneuert).

In späteren Untersuchungen wurde die Versuchsanordnung folgendermaßen modifiziert:

1. Für die Bebrütung in sauerstoffreicher Atmosphäre wurden 18 ml Bouillon in 100 ml-Erlenmeyer-Kolben gegeben; Menge des Inokulums 2 ml (Flachschichtkultur).
2. Die Bebrütung bei mittlerem Sauerstoffangebot erfolgte in Reagensgläsern: 9 ml Bouillon und 1 ml Inoculum (Hochschichtkultur).
3. Ein hypoxybiotisches Milieu wurde dadurch erreicht, daß unmittelbar vor der Beimpfung die in Reagensgläsern befindliche Bouillon 10 min lang zum Kochen gebracht, mit sterilem Paraffin überschichtet und schnell wieder abgekühlt wurde. Die bei der Probeentnahme erforderliche gleichmäßige Durchmischung der Kulturflüssigkeit wurde durch Anwendung eines Magnetrührers erzielt.

Die Feststellung der gesamten Bakterienzahl (d. h. der abgestorbenen und lebenden Keime) in den Bouillonkulturen erfolgte mit Hilfe der Bakterienzählkammer (Methode bei Reusse 1961a) und die Zählung der lebenden Bakterien mit dem Koch'schen Plattenverfahren. Der Dissoziationsgrad wurde durch Auszählen von mehreren 100 Einzelkolonien ermittelt, nachdem die Agarplatten zuvor 15 sec lang mit Kristallviolett übergossen worden waren.

Ergebnisse

Nach einer 48stündigen Versuchsdauer ist in der Kultur, durch die kontinuierlich Sauerstoff geleitet worden war, die Zahl der lebenden Bakterien um zwei Zehnerpotenzen größer als in der stationär bebrüteten Vergleichskultur. Die im angenäherten Vakuum bebrütete Kultur ist zu diesem Zeitpunkt noch völlig ungetrübt. Mit fortschreitender Versuchsdauer nimmt die Zahl der lebenden Bakterien in der Sauerstoffkultur stetig ab, bis schließlich bei Versuchsende nur noch etwa 3000 vermehrungsfähige Keime/ml Bouillon enthalten sind. Während der gesamten Versuchsdauer wird in dieser Kultur keine Dissoziation nachgewiesen.

Tabelle 1. *Wachstumsintensität und Dissoziationsgrad bei Brucellen in Abhängigkeit zu der Sauerstoffversorgung der Bouillon-Kultur*

Kontrolle nach Tagen	Einleitung von Sauerstoff in Kulturflüssigkeit (1)				Stationäre Bebrütung in Luftatmosphäre				Kultur in angenähertem Vakuum (2)			
	Trübung	Keimzahl/ml		Diss.-Grad in Prozent	Trübung	Keimzahl/ml		Diss.-Grad in Prozent	Trübung	Keimzahl/ml		Diss.-Grad in Prozent
		total	lebend			total	lebend			total	lebend	
2	++++	$1{,}6 \cdot 10^{10}$	$1{,}6 \cdot 10^{10}$	—	++	$1{,}7 \cdot 10^{8}$	$1{,}7 \cdot 10^{8}$	—	—	./.	./.	./.
4	++++	$1{,}5 \cdot 10^{10}$	$2{,}0 \cdot 10^{9}$	—	++	$1{,}4 \cdot 10^{8}$	$1{,}4 \cdot 10^{8}$	—	—	./.	./.	./.
7	++++	$1{,}7 \cdot 10^{10}$	$1{,}0 \cdot 10^{8}$	—	+++	$5{,}7 \cdot 10^{7}$	$5{,}7 \cdot 10^{7}$	0,1	+	$5{,}3 \cdot 10^{7}$	$5{,}6 \cdot 10^{7}$	51
10	++++	$1{,}3 \cdot 10^{10}$	$5{,}5 \cdot 10^{3}$	—	+++	$1{,}3 \cdot 10^{7}$	$1{,}3 \cdot 10^{7}$	1	+	$6{,}0 \cdot 10^{7}$	$6{,}8 \cdot 10^{7}$	69
14	++++	$1{,}5 \cdot 10^{10}$	$2{,}7 \cdot 10^{3}$	—	+++	$6{,}5 \cdot 10^{7}$	$6{,}5 \cdot 10^{7}$	86	++	$3{,}5 \cdot 10^{8}$	$1{,}8 \cdot 10^{8}$	93

Brucella abortus, 2308 S; Inoculum: $2 \cdot 10^{7}$ Keime/ml Bouillon; 250 ml Bacto-Tryptose Bouillon in 500 ml-Steilbrustflaschen; (1) Sauerstoff (10 Liter/Std) durch Berkefeldfilter in Kulturflüssigkeit geleitet; (2) Einstellen der Kultur in Zeissler-Topf, unvollständige Evakuierung; täglich zweimal erneuert; ./. = nicht untersucht.

Tabelle 2. *Wachstumsintensität und Dissoziationsgrad bei Brucellen in Abhängigkeit zu der Sauerstoffversorgung der Bouillon-Kultur*

Kontrolle nach Tagen	Flachschicht-Kultur (Erlenmeyer-Kolben)				Hochschicht-Kultur (Reagensglas)				Hochschicht-Kultur (Reagensglas) mit Paraffinüberschichtung (1)			
	Trübung	Keimzahl/ml		Diss.-Grad in Prozent	Trübung	Keimzahl/ml		Diss.-Grad in Prozent	Trübung	Keimzahl/ml		Diss.-Grad in Prozent
		total	lebend			total	lebend			total	lebend	
2	+++	$6{,}1 \cdot 10^{9}$	$3{,}1 \cdot 10^{9}$	—	+	$3{,}7 \cdot 10^{8}$	$2{,}5 \cdot 10^{8}$	—	—	$9{,}6 \cdot 10^{7}$	$5{,}5 \cdot 10^{7}$	—
4	+++	$8{,}2 \cdot 10^{9}$	$5{,}5 \cdot 10^{9}$	—	++	$3{,}4 \cdot 10^{9}$	$2{,}6 \cdot 10^{8}$	—	+	$8{,}9 \cdot 10^{7}$	$5{,}8 \cdot 10^{7}$	25
6	+++	$1{,}3 \cdot 10^{10}$	$5{,}1 \cdot 10^{9}$	—	++	$3{,}5 \cdot 10^{9}$	$3{,}0 \cdot 10^{8}$	19	+	$1{,}2 \cdot 10^{8}$	$1{,}1 \cdot 10^{8}$	44
8	+++	$1{,}2 \cdot 10^{10}$	$2{,}2 \cdot 10^{9}$	—	++	$3{,}6 \cdot 10^{9}$	$3{,}2 \cdot 10^{8}$	21	+	$1{,}6 \cdot 10^{8}$	$1{,}8 \cdot 10^{8}$	60
10	+++	$1{,}4 \cdot 10^{10}$	$1{,}5 \cdot 10^{9}$	—	++	$3{,}6 \cdot 10^{9}$	$3{,}0 \cdot 10^{8}$	28	+	$2{,}0 \cdot 10^{8}$	$1{,}8 \cdot 10^{8}$	63
12	+++	$1{,}5 \cdot 10^{10}$	$6{,}7 \cdot 10^{8}$	—	++	$3{,}6 \cdot 10^{9}$	$3{,}2 \cdot 10^{8}$	55	+	$2{,}5 \cdot 10^{8}$	$2{,}4 \cdot 10^{8}$	70

Brucella abortus, 2308 S; Inoculum: $5 \cdot 10^{6}$ Keime/ml Bouillon; 18 ml Bacto-Tryptose Bouillon in 100 ml-Erlenmeyer-Kolben + 2 ml Inoculum; 9 ml Bacto-Tryptose Bouillon in Reagensglas + 1 ml Inoculum; (1) Bouillon in Reagensglas 10 min gekocht, schnell abgekühlt und mit Paraffin überschichtet, dann beimpft; Durchschnittswerte aus drei Untersuchungsreihen.

Tabelle 3. *Wachstumsintensität und Dissoziationsgrad bei verschiedenen Bakterienarten in Abhängigkeit zu der Sauerstoffversorgung der Bouillon-Kultur*

Bakterienart	Flachschicht-Kultur			Hochschicht-Kultur		
	Keimzahl/ml		Diss.-Grad in Prozent	Keimzahl/ml		Diss.-Grad in Prozent
	total	lebend		total	lebend	
Past. pseudotuberculosis	$3{,}0 \cdot 10^9$	$9{,}2 \cdot 10^7$	10	$6{,}0 \cdot 10^8$	$9{,}3 \cdot 10^6$	1
Bac. anthracis	$5{,}1 \cdot 10^8$	$1{,}6 \cdot 10^7$	1	$2{,}4 \cdot 10^8$	$1{,}9 \cdot 10^6$	2
E. muriseptica	./.	./.	0	./.	./.	1
Br. bronchiseptica	$3{,}8 \cdot 10^9$	$3{,}0 \cdot 10^8$	0	$8{,}1 \cdot 10^8$	$4{,}4 \cdot 10^8$	9
S. paratyphi B	$5{,}9 \cdot 10^9$	$2{,}0 \cdot 10^8$	0	$2{,}5 \cdot 10^9$	$1{,}2 \cdot 10^8$	12
List. monocytogenes	$2{,}4 \cdot 10^9$	$1{,}3 \cdot 10^8$	0	$1{,}4 \cdot 10^9$	$7{,}5 \cdot 10^7$	25
S. dublin	$8{,}2 \cdot 10^9$	$1{,}3 \cdot 10^8$	4	$4{,}2 \cdot 10^9$	$2{,}2 \cdot 10^7$	40
E. coli	$4{,}7 \cdot 10^9$	$5{,}1 \cdot 10^7$	6	$8{,}1 \cdot 10^8$	$1{,}5 \cdot 10^7$	80

Bacto-Tryptose-Bouillon; Inoculum $5 \cdot 10^6$ Keime/ml Bouillon; Kontrolle nach 12 Tagen; ./. = nicht untersucht.

In der stationär bebrüteten Kultur wird erstmalig nach einer Woche eine schwache Dissoziation beobachtet und die Zahl der vermehrungsfähigen Keime bleibt bis zum Schluß hoch.

Die im angenäherten Vakuum bebrütete Kultur zeigt erst nach einer Woche eine schwache Trübung. Die Bakterien vermehren sich offenbar hier sehr langsam, sind aber zu diesem Zeitpunkt schon zu 50% mutiert. Gegen Ende des Versuches war aber auch in dieser Kultur ein hoher Bakteriengehalt feststellbar (Tab. 1).

Da die Ergebnisse mehrerer Versuchsreihen bei Anwendung dieser Technik stark schwankten, versuchte ich, die gewünschten Unterschiede in der Sauerstoffspannung auf andere Weise zu erhalten. In den folgenden Versuchen wurde die vorher beschriebene Flachschichtkultur, Hochschichtkultur und Paraffinhochschichtkultur verwendet. Mit dieser Technik ließen sich gut reproduzierbare Ergebnisse erzielen (Tab. 2). Der Einfluß des unterschiedlichen Sauerstoffangebotes für die Stärke der Dissoziation und des Keimwachstums tritt in diesen Versuchen noch deutlicher zutage: eine gute Sauerstoffversorgung der Bouillonkultur wirkt für S-Bakterien wachstumsfördernd, eine schlechte Sauerstoffversorgung dagegen wachstumshemmend.

Als nächstes versuchte ich zu klären, ob eine gute Sauerstoffversorgung der Kultur außer der wachstumsfördernden Wirkung für S-Zellen auch gleichzeitig eine wachstumshemmende Wirkung für Nicht-S-Zellen zur Folge hat und umgekehrt. Zu diesem Zweck wurde die in Tab. 2 beschriebene Versuchstechnik angewandt, mit dem einzigen Unterschied, daß die Kulturen nicht mit S-Formen, sondern mit einem Inoculum mutierter Bakterien beimpft worden waren. Die Feststellung der gesamten Keimzahl bzw. der Zahl lebender Bakterien erfolgte in der vorher beschriebenen Weise.

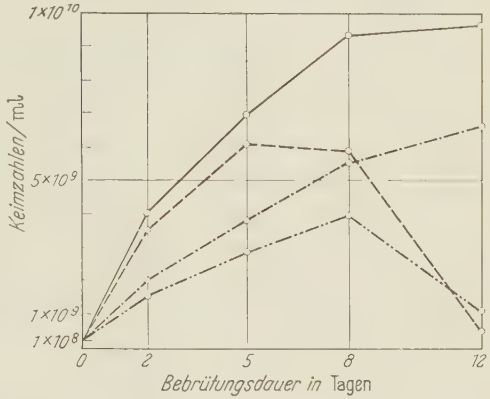


Abb. 1. Gesamtzahl und Zahl der lebenden Bakterien in Flachschicht-Kulturen (Erlenmeyer-Kolben). Brucella abortus-Stamm 2308, Bacto-Tryptose-Bouillon, Inoculum $5 \cdot 10^6$ Keime/ml. ——— S-Gesamtzahl; — — — S-lebend; —·—·— Nicht-S-Gesamtzahl } Wachstumskurven verschiedener Nicht-S-Inocula (R—M_1—PS) zusammengefaßt
·· —·· — Nicht-S-lebend }

Um das Verhalten verschiedener Mutanten bei unterschiedlicher Sauerstoffspannung zu untersuchen, führte ich diese Versuche mit R-, M_1- bzw. PS-Formen durch. Da sich aber diese verschiedenen Nicht-S-Zellen im Prinzip gleichartig verhielten, wurden die Ergebnisse zur besseren Übersicht in einer Kurve zusammengefaßt. Abb. 1 zeigt die Wachstumskurven (Gesamtzahl und Zahl der lebenden Bakterien) eines homogenen S-Zell- bzw. eines homogenen Nicht-S-Zell-Inoculums in sauerstoffreichen Flachschichtkulturen. Danach werden durch Sauerstoff *auch* mutierte Zellen im Wachstum gefördert, jedoch in geringerem Maße als S-Bakterien.

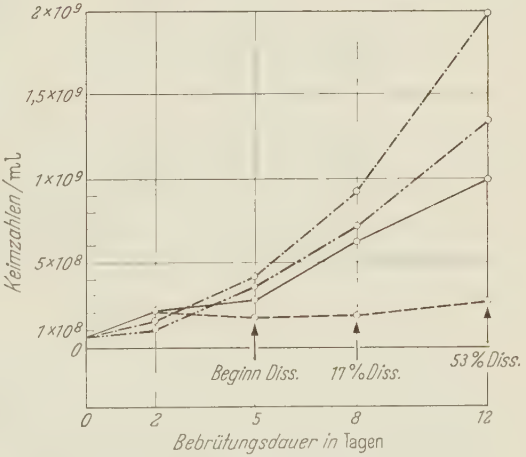


Abb. 2. Gesamtzahl und Zahl der lebenden Bakterien in Hochschicht-Kulturen (Reagensglas). Zeichenerklärung siehe Abb. 1

In den Abb. 2 und 3 sind die Wachstumskurven in sauerstoffärmeren Hochschichtkulturen bzw. sauerstoffarmen Paraffin-Hochschichtkulturen

dargestellt. Es geht hieraus hervor, daß durch einen Sauerstoffmangel S-Bakterien in stärkerem Maße als Nicht-S-Bakterien im Wachstum gehemmt werden.

In einer aus S- und Nicht-S-Zellen bestehenden Mischkultur wird infolgedessen bei Sauerstoffmangel die Vermehrung von S-Zellen stärker gehemmt als die Vermehrung von Nicht-S-Zellen, und es tritt eine schnelle und totale Dissoziation der Kultur auf.

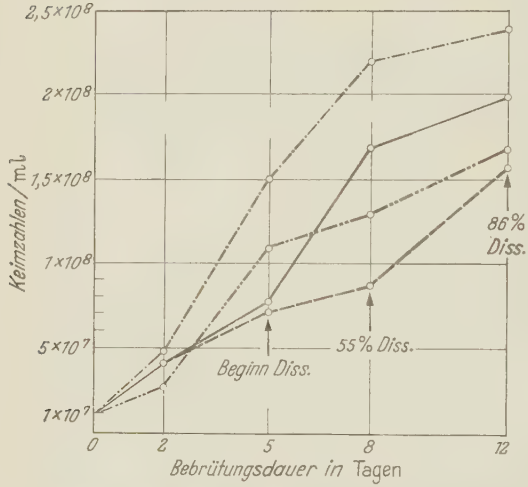


Abb. 3. Gesamtzahl und Zahl der lebenden Bakterien in Paraffin-Hochschicht-Kulturen (Hypoxybiose). Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Umgekehrt vermehren sich in Mischkulturen bei guter Sauerstoffversorgung die S-Zellen schneller als die Nicht-S-Zellen, so daß sich die S-Zellen mit der Zeit in der Kultur anreichern können (Reusse 1961 b, c).

Schließlich prüfte ich, ob auch bei anderen Bakterienspecies die Sauerstoffversorgung der Kultur einen Einfluß auf die Wachstumsintensität und den Dissoziationsgrad ausübt. Diese Untersuchungen wurden in Flachschichtkulturen im Erlenmeyer-Kolben und in Hochschichtkulturen im Reagensglas angesetzt. Es zeigte sich, daß bei einigen der geprüften Bakterienarten der Sauerstoff einen ähnlichen Einfluß auf Wachstumsrate und Dissoziationsgrad hat wie bei Brucellen (Tab. 3).

Diskussion

Die Umwandlung von der S- in die Nicht-S-Form ist nicht nur mit einer morphologisch erkennbaren Veränderung des Kolonienwachstums, sondern auch mit verschiedenen anderen Erscheinungen wie Virulenzabfall, Veränderung der Antigenstruktur und erhöhter Agglutinierbarkeit in Kochsalz und Säure gekoppelt. Sie beruhen alle auf einem Verlust des typenspezifischen Polysaccharid-Oberflächenantigens.

Die Dissoziation von Bakterienkulturen bzw. ihre Verhinderung ist also von großer praktischer Bedeutung.

Van Drimmelen (1956, 1958) hat sich die wachstumsfördernde und gleichzeitig dissoziationsverhindernde Wirkung des Sauerstoffs bei der Impfstoffbereitung zunutze gemacht. Ein ähnlicher Effekt wird erzielt,

wenn Bouillon-Kulturen mit großer Oberfläche und flacher Mediumschicht angelegt werden.

In einer Bouillon-Kultur im Reagensglas werden die Bakterien dagegen schlecht mit Sauerstoff versorgt, da infolge der hohen Flüssigkeitssäule nur eine minimale Lufterneuerung der obersten Bouillonschicht erfolgt. Infolge der Hypoxydose reichern sich Nicht-S-Formen an, und die Kultur dissoziiert nach mehr oder minder langer Bebrütungszeit. Die für das Zustandekommen der Dissoziation vielfach verantwortlich gemachten Einflüsse, wie Populationsdruck, Verbrauch der Nährstoffe oder die Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte, spielen gegenüber dem Sauerstoff — wenn überhaupt — nur eine untergeordnete Rolle.

Die Abhängigkeit der Wachstumsintensität und des Dissoziationsgrades von dem Sauerstoffangebot in der Kultur verhielt sich bei den meisten Bakterienarten ähnlich wie bei Brucellen.

Zusammenfassung

1. Die Wachstumsintensität und der Dissoziationsgrad einer Brucellen-Bouillonkultur sind weitgehend abhängig von der Sauerstoffversorgung.

2. Ein reiches Sauerstoffangebot führt in flüssigen Kulturen zu einem maximalen Bakterienwachstum bei gleichzeitiger Unterdrückung der Dissoziation. Dieser dissoziationsverhindernde Effekt kommt dadurch zustande, daß durch Sauerstoff besonders die Wachstumsintensität von S-Zellen erhöht wird.

3. In hypoxybiotischen Kulturen kommt es dagegen zu einem verzögerten Keimwachstum bei gleichzeitig hoher Dissoziationsrate. Das liegt daran, daß durch einen Sauerstoffmangel insbesondere S-Zellen in ihrem Wachstum unterdrückt werden.

4. Bei fünf der acht untersuchten Bakterienspecies übt Sauerstoff einen ähnlichen Einfluß auf die Wachstumsrate und den Dissoziationsgrad aus wie bei Brucellen.

Literatur

Arkwright, J. A.: Variation in bacteria in relation to agglutination by salts and by specific sera. J. Path. Bact. **23**, 358 (1920).

Braun, W., R. Altenbern, J. Kelsh and H. Sandoval: Anoxia as a major factor causing population changes in antiserum containing cultures. J. Bact. **71**, 417 (1956).

Van Drimmelen, G. C.: Strain 19 Brucella vaccine: I. Production of vaccine by the shake flask technique. Onderstepoort J. vet. Res. **27**, 205 (1956).

Van Drimmelen, G. C.: V. Mass production in the Brucella vortex aerated culture apparatus. Onderstepoort J. vet. Res. **27**, 539 (1958).

Gerhardt, Ph., and L. L. Gee: Brucella suis in aerated broth culture. J. Bact. **52**, 261, 271 (1946).

Glassman, H. N., and S. Elberg: The growth of Brucella in aerated liquid cultures. J. Bact. **52**, 423 (1946).

Huddleson, I. F.: Studies in Brucellosis III, Mich. State Coll. 1952.
Reusse, U.: Über die Dissoziation von Brucellen. Mh. Tierheilk. **10** (1958). Sonderteil: Rinder-Tbc und Brucellose **7**, 135, 143 (1958).
Reusse, U.: Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Katalase- und Ureaseprobe. Zbl. Vet.-Med. **8**, 341 (1961a).
Reusse, U.: Über die dissoziationsverhindernde Wirkung von Erythrocyten in Blutkulturen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 123 (1961b).
Reusse, U.: Der Einfluß von Sauerstoff auf die Selektion von S-Zellen aus dissoziierten Kulturen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 127 (1961c).
Sanders, E., and I. F. Huddleson: The influence of environmental conditions on the growth and dissoziation of Brucella abortus. Amer. J. vet. Res. **17**, 324 (1956).
Sanders, E., and I. F. Huddleson: The influence of atmospheric gases on the multiplication of Brucella. Amer. J. vet. Res. **11**, 70 (1950).

Dr. U. Reusse,
Veterinär-Untersuchungsstelle im Wehrbereich II, Hannover, Gehägestraße 20

Zeitschrift f. Hygiene 148, 123—126 (1961)

Aus dem Bernhard Nocht-Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten, Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. G. Nauck)
Abteilung für Veterinärmedizin (Leiter: Priv.-Doz. Dr. R. Schindler)

Über die dissoziationsverhindernde Wirkung von Erythrocyten in Blutkulturen*

Von
U. Reusse

(Eingegangen am 24. Juni 1961)

Bei der Isolierung pathogener Bakterien aus Organen, aus Sekreten oder Exkreten infizierter Menschen oder Tiere findet man häufig mehr oder weniger stark dissoziierte Kulturen. Derartige Beobachtungen wurden insbesondere bei Salmonellen, Brucellen und Rotlaufbakterien beschrieben (Kröger 1955; Alton 1960; Reusse 1958; Schoop 1951). Werden dagegen die Bakterien aus dem strömenden Blut isoliert, so enthalten die Blutkulturen ausschließlich S-Formen, selbst wenn sie erst nach einer Bebrütungszeit von zwei und mehr Wochen positiv werden.

Die Ursache für diese entgegengesetzten Befunde konnte auf Grund vorangegangener Untersuchungen (Reusse 1961) in einer unterschiedlichen Sauerstoffversorgung der Bakterien im Organismus bzw. in der Blutkultur liegen. Diese Untersuchungen hatten ergeben, daß eine sauerstoffreiche Bouillon-Kultur im Gegensatz zu einer hypoxybiotisch gehaltenen Kultur nicht dissoziiert. Es war daher zu vermuten, daß die Erythrocyten in ihrer Eigenschaft als Sauerstoffträger die Bakterien im strömenden Blut bzw. in der Blutkultur mit genügend Sauerstoff versorgen und auf diese Weise die Dissoziation verhindern. Infolgedessen dürfte in einer Blutkultur — selbst bei verlängerter Bebrütungszeit — keine Dissoziation auftreten. Zum Beweis dieser Theorie wurden die im folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

Material und Methoden

Defibriniertes Hammelblut wurde unter sterilen Kautelen dreimal mit einem NaCl-Phosphatpuffergemisch nach Sörensen (p_H 7,0) gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugieren füllte ich das Erythrocyten-Sediment mit einer auf p_H 7,0 gepufferten Bacto-Tryptose-Bouillon auf das ursprüngliche Volumen auf. Diese gepufferte Erythrocyten-Bouillon wurde in Mengen von 0-2-4-6 und 8 ml in Reagensgläser (mit eingelegtem Magnetkern) abgefüllt und 8-6-4-2 bzw. 0 ml gepufferte Bouillon hinzugegeben. Diese mit abfallenden Erythrocyten-Mengen vorbereiteten Blutkulturen wurden mit je $6 \cdot 10^6$ S-Formen des Brucella abortus-Stammes 2308

* Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

bzw. mit $3 \cdot 10^6$ S-Formen und $3 \cdot 10^6$ R-Formen desselben Stammes beimpft. Um bei den Kontrollen auf Dissoziationsformen eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien zu gewährleisten, wurden die Kulturen vor jeder Abimpfung (Ösenausstriche auf Agarplatten) mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt. Der Dissoziationsgrad wurde durch Auszählung von mindestens 100 Kolonien der zuvor mit Kristallviolett übergossenen Platten bestimmt.

Ergebnisse

Mit steigendem Erythrocytengehalt in der Kultur nimmt der Dissoziationsgrad ab und umgekehrt. Selbst nach einer 40tägigen Bebrütungsdauer konnten in der Kultur mit dem größten Erythrocytenanteil keinerlei Dissoziationsformen festgestellt werden (Tab. 1).

Tabelle 1. *Einfluß von Erythrocyten auf die Dissoziation*

Gewaschene Erythrocyten[1]	Gepufferte Bouillon	Dissoziationsgrad in Prozent nach Tagen						
		5	10	15	25	30	35	40
8 ml	+ 0 ml	0	0	0	0	0	0	0
6 ml	+ 2 ml	0	0	13	18	17	21	15
4 ml	+ 4 ml	0	0	10	26	13	17	11
2 ml	+ 6 ml	14	39	79	83	75	82	82
0 ml	+ 8 ml	46	67	66	96	100	100	100

Hochschichtkulturen in Reagensgläsern (mit Magnetkern). Inoculum: Brucella abortus-Stamm 2308, S-Formen: $6 \cdot 10^6$ Keime.

[1] Defibriniertes Hammelblut dreimal in NaCl-Phosphatpuffer (p_H 7,0) gewaschen und mit gepufferter Bacto-Tryptose-Bouillon auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

Tabelle 2. *Einfluß von Erythrocyten auf die Dissoziation*

Gewaschene Erythrocyten	Gepufferte Bouillon	Dissoziationsgrad in Prozent nach Tagen						
		5	10	15	25	30	35	40
8 ml	+ 0 ml	67	23	75	61	70	0	0
6 ml	+ 2 ml	78	45	69	43	55	1	0
4 ml	+ 4 ml	67	16	68	47	62	1	0
2 ml	+ 6 ml	86	64	68	74	31	26	13
0 ml	+ 8 ml	74	95	99	99	100	100	100

Hochschichtkulturen in Reagensgläsern (mit Magnetkern) Inoculum: Brucella abortus-Stamm 2308: S-Formen: $3 \cdot 10^6$ Keime und R-Formen: $3 \cdot 10^6$ Keime.

Mit dem nächsten Versuch wollte ich feststellen, ob in erythrocytenhaltigen Kulturen eine Selektion der S-Zellen stattfindet, wenn zur Hälfte S- bzw. R-Formen eingeimpft worden waren (Tab. 2).

Abschließend untersuchte ich den Einfluß von Erythrocyten auf die Dissoziation noch einmal unter Praxisverhältnissen. Hierfür benutzte

ich die Duolite-Blutkulturmethode nach Huddleson (1957, 1959). In 50 ml-Kulturflaschen, die 0,4 g Duolite-C-3 (Ionentauscher) und 2 ml einer 5%igen Natrium-Citratlösung enthielten, wurden 10 ml steril entnommenes Citratblut gegeben und mit etwa 30 Brucellen beimpft. Diese Blutkulturen erwiesen sich über die gesamte Versuchsdauer (50 Tage) stabil, d. h. es konnte keinerlei Dissoziation festgestellt werden. In entsprechend gepufferten Kontrollkulturen, die an Stelle von Blut jetzt lediglich Bouillon enthielten, traten die ersten dissoziierten Bakterien dagegen bereits nach dreiwöchiger Inkubation auf.

Diskussion

Wie die Versuche erkennen lassen, wird durch Blut bzw. Blutkörperchen die Dissoziation verhindert. Es ist zu vermuten, daß der an das Hämoglobin der Erythrocyten gebundene Sauerstoff diese Wirkung ausübt. Damit findet auch die Tatsache eine Erklärung, daß Blutkulturen trotz häufig verlängerter Bebrütungsdauer kaum dissoziierte Bakterien enthalten und daß andererseits bei Isolierungen von Bakterien aus Organen bzw. Se- oder Exkreten des öfteren Nicht-S-Keime gefunden werden. Ein typisches Beispiel hierfür ist die häufige Isolierung dissoziierter Kulturen aus Abscessen oder aus dem Labmagen abortierter Rinderfeten. Daß bei der Züchtung von Salmonellen oder Rotlaufbakterien aus chronisch infizierten Menschen oder Tieren ebenfalls hin und wieder R-Formen gefunden werden, mag wohl zum Teil auch mit einer mangelhaften Sauerstoffversorgung der Bakterien zusammenhängen.

Werden Meerschweinchen mit einem aus S- und R-Zellen bestehenden Brucellengemisch infiziert, so findet man eine Woche später in diesen Versuchstieren fast nur S-Formen wieder. Wenn aber derselbe Versuch mit Hühnern durchgeführt wird, können fast ausschließlich dissoziierte Keime nachgewiesen werden (Kraft u. Braun 1952). Eine unterschiedliche Sauerstoffspannung dürfte in diesem Falle keine Rolle spielen. Es ist viel wahrscheinlicher, daß die Ursache der Dissoziation im Organismus von Hühnern mit der höheren physiologischen Körpertemperatur der Vögel in Zusammenhang steht. In eigenen noch nicht veröffentlichten Untersuchungen konnte nämlich festgestellt werden, daß die Bebrütung von Brucellenkulturen bei 41° C eine Hemmung des Keimwachstums und darüber hinaus eine weitaus schnellere Dissoziation zur Folge hat als die Bebrütung bei 37° C.

Zusammenfassung

1. In Bouillon-Kulturen, denen gewaschene Hammel-Erythrocyten zugesetzt worden waren, konnte während einer 40tägigen Versuchsdauer keine Dissoziation nachgewiesen werden.

2. Je geringer die Zahl der zugesetzten Erythrocyten in der Kultur war, in desto stärkerem Maße traten Dissoziationen auf.

3. Bei einem zur Hälfte aus S- und R-Zellen bestehenden Inoculum wurden in Bouillon-Kulturen, denen Erythrocyten zugesetzt worden waren, die S-Zellen gegenüber den Nicht-S-Zellen angereichert.

4. Es wird vermutet, daß die Erythrocyten in ihrer Eigenschaft als Sauerstoffträger dissoziationsverhindernd wirken.

Literatur

Alton, G. G.: The occurrence of dissociated strains of Br. melitensis in the milk of goats in Malta. J. comp. Path. **70**, 10 (1960).

Huddleson, I. F.: Factors that promote the growth of Brucella in the presence of blood. Bull. Wld Hlth Org. **16**, 929 (1957).

Huddleson, I. F.: Growth of bacteria in blood. Use of Cation Exchange Resins for enhancing or suppressing growth. Bull. Wld Hlth Org. **21**, 187 (1959).

Kraft, M., and W. Braun: Relationships between host susceptibility and selective effects on Brucella variants in vivo. Bact. Proc. **1952**, 78.

Kröger, E.: Die Variationen S/R und O/o insbesondere bei gramnegativen Darmbakterien. Ergebn. Hyg. Bakt. **29**, 475 (1955).

Reusse, U.: Über die Dissoziation von Brucellen. Mh. Tierheilk. **10**, Sonderteil: Rindertuberkulose und Brucellose **7**, 135 (1958).

Reusse, U.: Das Verhalten von Brucellen und verschiedenen anderen Bakterien in sauerstoffreichen bzw.-armen Bouillon-Kulturen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 115 (1961).

Schoop, G.: Der Herzklappenrotlauf, eine Sepsis lenta beim Schwein. Mh. Tierheilk. **3**, 129 (1951).

Dr. U. Reusse,
Veterinär-Untersuchungsstelle im Wehrbereich II, Hannover, Gehägetraße 20

Zeitschrift f. Hygiene 148, 127—130 (1961)

Aus dem Bernhard Nocht-Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten, Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. G. Nauck)
Abteilung für Veterinärmedizin (Leiter: Priv.-Doz. Dr. R. Schindler)

Der Einfluß von Sauerstoff auf die Selektion von S-Zellen aus dissoziierten Kulturen*

Von
U. Reusse

(Eingegangen am 24. Juni 1961)

In der vorliegenden Arbeit sollte festgestellt werden, wieviel S-Bakterien in einer dissoziierten Kultur mindestens enthalten sein müssen, damit sie sich bei sauerstoffreicher Bebrütung gegenüber den Nicht-S-Bakterien anreichern können. Außerdem sollte geprüft werden, ob in einer homogenen Nicht-S-Zell-Kultur durch sauerstoffreiche Bebrütung eventuell vorhandene S-Zellen selektiert werden können.

Material und Methoden

Eine sauerstoffreiche Bebrütung wurde mit Hilfe von Flachschicht-Bouillon-Kulturen im Erlenmeyer-Kolben erreicht. Als Kulturmedium diente Bacto-Tryptose-Bouillon. Die Kulturen wurden mit einem aus S- und Nicht-S-Zellen bestehenden Inoculum (M- bzw. R-Formen; Nomenklatur nach Huddleson 1952) des Brucella abortus-Stammes 2308 beimpft. Während für jede Kultur die Zahl der Nicht-S-Zellen konstant bei 10^8 bzw. 10^9 Bakterien lag, wurden die S-Bakterien in abfallenden Mengen zugegeben. Das Verhältnis von S-Zellen zu Nicht-S-Zellen betrug bei den einzelnen Kulturen 1 : 10 bis 1 : 1 Milliarde. Gleichzeitig wurden zur Kontrolle Kulturen mit einem homogenen Inoculum von S-Zellen bzw. Nicht-S-Zellen beimpft.

Die während der langen Bebrütungsdauer verdunstete Kulturflüssigkeit wurde im Abstand von 10—14 Tagen mit aqua destillata aufgefüllt. Die Kulturgefäße wurden täglich zweimal geschwenkt.

Zur Kontrolle wurde derselbe Versuch gleichzeitig als Hochschicht-Bouillon-Kultur in Reagensgläsern (sauerstoffarme Bebrütung) angesetzt. Die Feststellung des Dissoziationsgrades erfolgte in der früher beschriebenen Weise.

Außerdem wurde versucht, aus 13 homogenen Nicht-S-Zell-Inocula von sechs weiteren Brucellenstämmen aller drei Typen mit Hilfe der sauerstoffreichen Bebrütung S-Zellen zu isolieren. Folgende Kulturmethoden gelangten zur Anwendung:

1. Flachschicht-Kultur im Erlenmeyer-Kolben,
2. permanente Sauerstoffeinleitung in die Kulturflüssigkeit und
3. kontinuierliche Umwälzung der Kulturflüssigkeit in Erlenmeyer-Kolben bzw. Reagensgläsern mit Hilfe des Magnetrührers.

* Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Ergebnisse

Die mit einem homogenen S-Inoculum beimpfte Kultur (Tab. 1) blieb während der gesamten Versuchsdauer stabil, d. h. es konnte keine Dissoziation nachgewiesen werden. Bei den gleichzeitig mit S- und M_3-Formen beimpften Kulturen wurden regelmäßig die in der Überzahl inoculierten M_3-Zellen von den S-Zellen überwuchert, bis die Kulturen am Ende des Versuches fast ausschließlich aus S-Zellen bestanden. Je geringer der S-Zell-Anteil im Inoculum gewesen war, desto langsamer reicherte sich diese Zellart in der Kultur an. Auch bei einem in der Kolonieform homogenen M_3-Zell-Inoculum konnten erstmalig nach 12 Tagen S-Bakterien nachgewiesen werden. Diese S-Bakterien reicherten sich ebenfalls in der Kultur an.

Tabelle 1. *Der Einfluß von Sauerstoff auf die Selektion von S-Zellen in der Mischkultur*

Inoculum: S + Nicht-S (M_3)	Verhältnis: S : Nicht-S (M_3)	Dissoziationsgrad in Prozent nach Tagen							
		5	12	16	24	31	42	48	53
10^8 + 0	100%	0	0	0	0	0	0	0	0
10^7 + 10^8	1 : 10	58	4	0	0	0	0	0	0
10^5 + 10^8	1 : 1000	69	14	0	1	0	0	1	0
10^3 + 10^8	1 : 100000	83	25	40	27	31	49	15	1
10^1 + 10^8	1 : 10 Mill.	83	46	71	60	50	26	7	0
0 + 10^8	100%	100	93	91	64	49	31	33	1

Flachschicht-Kulturen im Erlenmeyer-Kolben; Bacto-Tryptose-Bouillon; Brucella abortus-Stamm 2308, S- und M_3-Formen.

Tabelle 2. *Der Einfluß von Sauerstoff auf die Selektion von S-Zellen in der Mischkultur*

Inoculum: S + R	Verhältnis: S : R	Dissoziationsgrad in Prozent nach Tagen									
		5	9	16	22	29	36	43	50	57	64
10^9 + 0	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^7 + 10^9	1 : 100	80	74	25	13	8	8	0	0	0	0
10^5 + 10^9	1 : 10000	99	99	75	75	17	25	20	17	11	8
10^3 + 10^9	1 : 1 Mill.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10^1 + 10^9	1 : 100 Mill.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0 + 10^9	100%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Flachschicht-Kulturen im Erlenmeyer-Kolben; Bacto-Tryptose-Bouillon; Brucella abortus-Stamm 2308, S- und R-Formen.

Der gleiche Versuch wurde parallel in Reagensgläsern, also in einem sauerstoffarmen Milieu angesetzt. Nur die mit einem homogenen S-Zell-Inoculum beimpfte Kultur enthielt bis zum 16. Tag noch nachweisbare S-Bakterien. In keiner der anderen Kulturen konnten dagegen jemals S-Bakterien nachgewiesen werden.

Der oben beschriebene Versuch wurde in derselben Anordnung wiederholt, nur daß jetzt an Stelle der vorher verwendeten M_3-Formen als

Nicht-S-Zell-Inoculum R-Formen eingeimpft wurden. Hier beobachtete ich eine Selektion der S-Zellen letztmalig, wenn das Verhältnis S : R im Inoculum 1 : 10000 betragen hatte (Tab. 2).

Aus den mit 13 verschiedenen homogenen Nicht-S-Zell-Inocula mehrerer Brucellenstämme beimpften Kulturen konnten in sieben Fällen, also zu rund 50%, S-Formen isoliert werden. Hierzu war teilweise eine Bebrütung von mehreren Wochen notwendig. Die Einleitung von Sauerstoff in die Kulturflüssigkeit bzw. die Anwendung eines Magnetrührers erbrachte dabei keinen sichtbaren Vorteil gegenüber der Flachschichtkultur.

Diskussion

Mit Hilfe der Flachschicht-Kultur-Methode im Erlenmeyer-Kolben konnten regelmäßig aus dissoziierten Kulturen, die bei der Beimpfung 0,01% bzw. 0,001% S-Zellen enthalten hatten, die vorhandenen S-Zellen selektiert und angereichert werden. Bei einer weiteren Verminderung des S-Anteils im Inoculum gelang die Isolierung nur noch ausnahmsweise.

Weiter konnten wiederholt aus homogenen Nicht-S-Zell-Kulturen S-Zellen selektiert und ebenfalls in der Kultur angereichert werden. Es erhebt sich die Frage, ob bereits mit dem Inoculum einige S-Zellen in die Kultur gelangt waren oder ob eine Rückmutation $M_3 \rightarrow S$ stattgefunden hatte. Auf Grund früherer Untersuchungen (Reusse 1958) liegt die Vermutung nahe, daß es sich in diesen Fällen tatsächlich um Rückmutationen gehandelt hat, doch läßt sich der einwandfreie Beweis nur mit Hilfe von Ein-Zell-Kulturen erbringen.

Bei dem in Tab. 1 aufgeführten Versuch sind vermutlich Selektionen und Rückmutationen nebeneinander aufgetreten.

Für die Isolierung von S-Zellen aus stark dissoziierten Kulturen eignet sich auf Grund der geschilderten Untersuchungen die Flachschicht-Kultur-Methode im Erlenmeyer-Kolben besonders wegen ihrer guten Sauerstoffversorgung. Die Anwendung anderer Kulturmethoden mit verstärkter Sauerstoffversorgung zeigte keinen Vorteil gegenüber der Flachschicht-Kultur-Methode.

Zusammenfassung

1. Beimpft man Bouillon-Kulturen im Reagensglas mit einem aus S- und Nicht-S-Bakterien bestehenden Inoculum, so werden die S-Zellen bald von den dissoziierten Bakterien überwuchert.

2. Wird das gleiche Inoculum in sauerstoffreiche Bouillon-Kulturen (Flachschicht-Kultur) im Erlenmeyer-Kolben gegeben, so reichern sich umgekehrt die S-Zellen an, bis die Kultur schließlich nur noch aus S-Zellen besteht.

3. Es konnte experimentell bewiesen werden, daß S-Zellen regelmäßig in Flachschicht-Kulturen selektiert werden, wenn das Inoculum zwischen 0,01% und 0,001% S-Zellen enthalten hatte.

4. Für die Isolierung von S-Zellen aus dissoziierten Kulturen eignet sich besonders die Flachschicht-Kultur-Methode.

Literatur

Huddleson, I. F.: Studies in Brucellosis III, Mich. State Coll. Agricultural Exp. Station 1952.

Reusse, U.: Zur spontanen und induzierten Rückdissoziation bei Brucellen. Zbl. Vet.-Med. **5**, 329 (1958).

Dr. U. Reusse,
Veterinär-Untersuchungsstelle im Wehrbereich II, Hannover, Gehägestraße 20

Zeitschrift f. Hygiene 148, 131—134 (1961)

Aus dem Bernhard Nocht-Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten, Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. G. Nauck)
Abteilung für Veterinärmedizin (Leiter: Priv.-Doz. Dr. R. Schindler)

Untersuchungen zur dissoziations-induzierenden Wirkung des Alanins bei Brucellen*

Von
U. Reusse

(Eingegangen am 24. Juni 1961)

In den letzten Jahren wurden von Braun u. Mitarb. (Literatur bei Braun 1953) Untersuchungen über die Ursache der Dissoziation von Brucellen in flüssigen Kulturen durchgeführt und dabei folgende Beobachtungen gemacht. Werden sterile Filtrate alter Kulturen frischen Bouillon-Kulturen zugesetzt, so dissoziierten diese viel schneller als die Kontrollen. Mit Hilfe der Papierchromatographie konnten die Autoren weiter feststellen, daß es in Bouillon-Kulturen im Laufe der Bebrütung zu einer progressiven Anhäufung von Alanin kommt. Das war auch dann der Fall, wenn die Bakterien in synthetischen Medien gezüchtet worden waren, die ursprünglich keinerlei Alanin enthalten hatten. Es wurde daher angenommen, daß Alanin von den Bakterien selbst durch Aminierung bzw. Transaminierung gebildet wird. Wurde frischen Bouillon-Kulturen Alanin zugesetzt, so trat ebenfalls eine schnelle Dissoziation ein. Und schließlich konnte festgestellt werden, daß durch Alanin das Wachstum von S-Zellen in hohem Grade unterdrückt wird, das Wachstum von Nicht-S-Zellen dagegen kaum. Die Autoren folgerten daher, daß in flüssigen Kulturen das von den Brucellen selbst gebildete Alanin eine Selektion der Nicht-S-Zellen herbeiführe, also für die schnelle Dissoziation einer Bouillon-Kultur verantwortlich sei. Nach Braun (1953) konnten auch bei anderen Bakterienarten toxisch wirkende Stoffwechselprodukte für die Anreicherung von Nicht-S-Bakterien in flüssigen Kulturen festgestellt werden.

Sanders u. Huddleson (1956) äußerten Zweifel an dieser Alanintheorie. Nach Zugabe von 0,2% DL-Alanin zu frischen Bouillon-Kulturen in Reagensgläsern beobachteten sie eine signifikant stärkere Dissoziation als in den Kontrollen. Wenn sie aber denselben Versuch mit Kulturen ansetzten, durch die während der gesamten Bebrütungsdauer Sauerstoff geleitet worden war, so trat keinerlei Dissoziation auf. Diese Befunde

Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

konnten in eigenen, unveröffentlichten Untersuchungen bestätigt werden. Infolgedessen besteht zwischen Alanin und Sauerstoff offenbar ein Antagonismus, bei dem die wachstumshemmende Wirkung des Alanins für S-Zellen durch den wachstumsfördernden Sauerstoffgehalt der Kultur aufgehoben und übertroffen wird.

In anderen Untersuchungen (Reusse 1961b) konnte festgestellt werden, daß bei guter Sauerstoffversorgung von Bouillon-Kulturen eine nachweisbare Dissoziation selbst nach einer Bebrütungsdauer von mehr als 7 Wochen ausblieb. Daher erhob sich die Frage, ob überhaupt eine Anreicherung von Stoffwechselprodukten eine Selektion von Nicht-S-Zellen bewirkt.

Material und Methoden

Für die im folgenden geschilderten Untersuchungen wurde eine Bacto-Tryptose-Bouillon-Kultur ausgewählt, in die während der gesamten Bebrütungsdauer Sauerstoff eingeleitet worden war. Diese Kultur enthielt nach 14tägiger Bebrütung $1{,}5 \cdot 10^{10}$ Bakterien/ml, von denen allerdings nur noch 3000 Keime/ml lebten. Während des gesamten Wachstums wurden nur S-Bakterien in der Kultur festgestellt (Reusse 1961a, Tab. 1). Am Ende der Bebrütungszeit wurde die Kultur scharf zentrifugiert und der Überstand nach Einstellen des p_H-Wertes auf 7,0 in Reagensgläser bzw. Erlenmeyer-Kolben abgefüllt und autoklaviert (weitere Bezeichnung: „Sauerstoff-Blln.").

In gleicher Weise wurde eine Kultur behandelt, die 37 Tage unter einer verminderten Sauerstoffspannung bebrütet worden war und ausschließlich Nicht-S-Bakterien enthielt (weitere Bezeichnung: „Hypoxybiose-Blln.").

Diese verschiedenen Kulturflüssigkeiten wurden pro Milliliter mit $6 \cdot 10^2$ Bakterien in der S-Form bzw. einem Gemisch aus S- und Nicht-S-Bakterien des Brucella-abortus-Stammes 2308 beimpft. Die Feststellung der Keimzahlen bzw. des Dissoziationsgrades erfolgte in der früher beschriebenen Weise.

In weiteren Versuchsreihen wurde diesen Kulturflüssigkeiten vor ihrer Beimpfung 50 γ bzw. 135 γ Desoxyribonuclease (DNase) mit und ohne Zusatz von 0,003 m $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ zugefügt, um eine mögliche Desoxyribonucleinsäure (DNS)-Wirkung auszuschalten.

Ergebnisse

Je eine Sauerstoff-, eine Hypoxybiose- und eine frische Bouillon wurden mit einem Mischinoculum, bestehend aus 65% S- und 35% Nicht-S-Zellen, beimpft und als Flachschicht-Kulturen im Erlenmeyer-Kolben 87 Tage lang bebrütet. In allen drei Kulturarten trat eine schnelle Selektion der S-Bakterien auf, und nach rund zweiwöchiger Bebrütung konnten keine Nicht-S-Bakterien mehr festgestellt werden. Die Zahl der lebenden Bakterien in der Kontrollkultur (frische Blln.) war während des gesamten Versuches fast um eine Zehnerpotenz höher als in den beiden anderen Kulturarten.

Der gleiche Versuch wurde in Hochschichtkulturen im Reagensglas angesetzt, wobei das Inoculum jetzt aber nur aus S-Bakterien bestand. Während einer 87tägigen Bebrütungsdauer war in den Sauerstoff- und

Hypoxybiose-Boullion-Kulturen keine Dissoziation festzustellen. Die mit frischer Bacto-Tryptose-Bouillon angelegte Kontrolle enthielt aber bereits am 8. Bebrütungstag 23% Nicht-S-Bakterien und war am 20. Tage vollständig dissoziiert. Die Zahl der lebenden Bakterien war in diesen Kontroll-Kulturen jedoch bis zu einer Zehnerpotenz höher als in den beiden anderen Kulturarten (Tabelle).

Tabelle. *Einfluß von alter Kulturflüssigkeit auf die Dissoziation von Brucellen*

Kontrolle nach Tagen	Sauerstoff-Bouillon		Hypoxybiose-Bouillon		Frische Bouillon	
	lebende Keime	davon S-Zellen (%)	lebende Keime	davon S-Zellen (%)	lebende Keime	davon S-Zellen (%)
4		100		100		100
8		100		100		77
12	$3{,}2 \cdot 10^7$	100	$3{,}4 \cdot 10^7$	100	$2{,}6 \cdot 10^8$	26
16		100		100		1
21	$2{,}7 \cdot 10^7$	100	$1{,}6 \cdot 10^7$	100	$2{,}8 \cdot 10^8$	0
36	$6{,}6 \cdot 10^7$	100	$7{,}0 \cdot 10^7$	100	$1{,}6 \cdot 10^8$	0
40—87		100		100		0

Brucella abortus-Stamm 2308, S-Form; Inoculum: $6 \cdot 10^2$ Keime/ml Blln.; Kulturen im Reagensglas, stationär bebrütet. Weitere Einzelheiten im Text.

Der dissoziationsverhindernde Effekt alter Bouillon-Kulturen könnte durch freie Bakterien-DNS bedingt sein. Ich setzte daher den verschiedenen Nährmedien vor ihrer Beimpfung sterile DNase und Magnesiumsulfat in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen zu. Da auch jetzt eine Dissoziation in der „Sauerstoff-" bzw. „Hypoxybiose-Bouillon"-Kultur ausblieb, ist anzunehmen, daß DNS nicht die Ursache dieses Phänomens ist.

Diskussion

In den hier mitgeteilten Untersuchungen wird ein starker, die Dissoziation verhindernder Effekt alter Bouillon-Kultur-Sterilisate festgestellt. Diese Wirkung trat auch dann auf, wenn die Bouillon-Kulturen ursprünglich mit einem Nicht-S- bzw. Mischinoculum beimpft gewesen waren. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen von Braun u. Mitarb. (1953), die in alten Nährmedien eine beschleunigte Dissoziation feststellten.

Die Frage kann noch nicht entschieden werden, welcher Faktor für die Verhinderung der Dissoziation in alten Bouillon-Kultur-Sterilisaten verantwortlich ist. Desoxyribonucleinsäure als mögliches transformierendes Agens konnte ausgeschlossen werden.

Zusammenfassung

1. In alten Brucella-Bouillon-Kulturen konnte ein Faktor ermittelt werden, der eine dissoziationsverhindernde Wirkung entfaltet.

2. Ein Alaninzusatz zu frischen Bouillon-Kulturen im Reagensglas fördert den Eintritt und die Stärke der Dissoziation. Bei einem Alaninzusatz zu frischen Bouillon-Kulturen im Erlenmeyer-Kolben (sauerstoffreiches Milieu) bleibt die Dissoziation aus. Infolgesdesen besteht ein direkter Antagonismus zwischen Alanin und Sauerstoff.

3. Die von anderen Autoren für den Eintritt der Dissoziation in Reagensglaskulturen verantwortlich gemachte Anhäufung von Alanin konnte nicht bestätigt werden.

Literatur

Braun, W.: Bacterial Genetics. Philadelphia: W. B. Saunders Co. 1953.

Reusse, U.: Das Verhalten von Brucellen und verschiedenen anderen Bakterienarten in sauerstoffreichen bzw. -armen Bouillonkulturen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 115 (1961a).

Reusse, U.: Über die dissoziationsverhindernde Wirkung der Erythrocyten in Blutkulturen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 123 (1961b).

Reusse, U.: Zur spontanen und induzierten Rückdissoziation bei Brucellen. Zbl. Vet.-Med. **5**, 329 (1958).

Sanders, E., and I. F. Huddleson: The influence of environmental conditions on the growth and dissociation of Brucella abortus. J. Vet. Res. **17**, 324 (1956).

Dr. U. Reusse,
Veterinär-Untersuchungsstelle im Wehrbereich II, Hannover, Gehägestraße 20

Zeitschrift f. Hygiene 148, 135—141 (1961)

Aus dem Ärztefortbildungsinstitut (Lehrstuhl für Mikrobiologie und Virologie), Sofia, dem Veterinärforschungsinstitut für Lebensmittelhygiene, Sofia, und der Salmonella-Zentrale am Hygienischen Institut der Freien und Hansestadt Hamburg

Salmonellabefall von Landschildkröten (testudo graeca) in Bulgarien

I. Mitteilung

Von

I. Dimow, W. Wesselinoff und R. Rohde

(Eingegangen am 5. August 1961)

In der Fachliteratur finden sich zahlreiche Mitteilungen über die Isolierung von Salmonella- bzw. Arizonakulturen aus Kaltblütern, insbesondere Schlangen, Eidechsen u. a.[9,10,19]. Auf den Salmonellabefall speziell von Schildkröten wiesen zum erstenmal McNeil u. Hinshaw (1946) hin, die über die Isolierung von S. sandiego, S. newport und S. florida berichteten. Bruner u. Moran (1949) haben S. newport und S. san-diego ebenfalls aus Schildkröten isoliert. Später konnten Boycott, Taylor u. Douglas[1], als sie in den Jahren 1951—1952 13 Schildkröten untersuchten, 18 verschiedene Salmonella-species nachweisen, von denen S. rowbarton, S. bleadon, S. taunton, S. uphill, S. weston und S. marylebon zum erstenmal beschrieben wurden. Die gleichen Autoren isolierten auch einen Salmonella-ähnlichen Stamm (Paracoli 1385/51), der Salicin spaltet, Gelatine verflüssigt und die Antigenformel 4,12 : b : — besitzt. Bei der Untersuchung weiterer sechs Schildkröten, die zu den Arten testudo denticulata, test. elegans, test. nigrita und test. gigantea gehörten, konnten jedoch keine Salmonellen gefunden werden. Douglas u. Taylor[3] beschrieben drei neue aus Schildkröten isolierte Salmonella-species: S. clifton, S. langford und S. sarajane. Ludkin (1955) und Thomas (1957) züchteten aus Schildkröten Kulturen[13], die dem von Boycott u. Mitarb. beschriebenen Stamm Paracoli 1385/51 = 4,12 : b : — ähnlich waren. Sandbu u. Bövre[12] berichteten über den Nachweis einer neuen Salmonella-species: S. adamstua aus test. graeca, die aus Griechenland bezogen wurde. Nach der persönlichen Mitteilung von Boycott (1961) waren 75% von test. hermani, die aus Jugoslawien (Dalmatien) stammten, Salmonellaträger. Vincent, Neel u. Le Minor[15] konnten bei über 96% von test. graeca in Marokko einen Salmonellabefall feststellen und zugleich 15 verschiedene Salmonella-species, darunter eine neue (S. tanger) und S. virginia mit zweiter H-Phase, identifizieren. Bei den meisten Tieren wurden zugleich mehrere Salmonellatypen (bis zu vier) gefunden. Bei sehr vielen Salmonella-species handelte es sich um solche, die als Krankheitserreger bei Menschen bekannt waren. In drei Fällen fanden sie auch den bereits erwähnten Salmonella-ähnlichen Typ 4,12 : b : —, auf den wir später nochmals zurückkommen werden. In Anbetracht der enorm hohen Ausbeute von über 96% äußerten die Autoren die Vermutung, daß Salmonellen geradezu zur normalen Darmflora bei Schildkröten gehören könnten, jedenfalls bei testudo graeca. Andere Schildkrötenarten erwiesen sich bei ihren Untersuchungen nämlich seltsamerweise nur als gering oder überhaupt nicht befallen. Hirsch stellte in Israel zu 75% einen positiven Salmonellabefund bei Schildkröten fest. Bei Untersuchungen von Kotproben der test. chilenensis, die Boycott aus Argentinien erhalten hatte, erwiesen sich dagegen nur 1%

als Salmonellaträger. Daß die Schildkröten aus den Mittelmeergebieten in so hohem Grade befallen sind, schreibt Boycott der Koprophagie dieser Tiere zu. Auch in der deutschen Literatur finden sich Arbeiten über Salmonellabefunde bei Schildkröten. 1957 berichteten Klein u. Thur[8] über einen neuen Serotyp: S. westpark, den sie aus einer im Krefelder Tierpark gestorbenen südafrikanischen Panther- oder Leopardenschildkröte (test. pardalis) isoliert hatten. Wittig, Sulzbacher u. Seeliger[18] wiesen aus Kotproben von Schildkröten des Zoos in Halle außer einer neuen Salmonella-species: S. halle, auch S. abony, S. braenderup, S. canastel und S. mikawasima nach, was sie zu der allgemeinen Feststellung veranlaßte, daß Schildkröten wohl ein wichtiges Salmonella-Reservoir, das auch bei epidemiologischen Ermittlungen nicht übersehen werden dürfe, darstellten. In jüngster Zeit untersuchten Kiesewalter, Rudat u. Seidel[7] insgesamt 556 Schildkröten, darunter 528 aus Albanien importierte griechische Landschildkröten. 36,55% der griechischen Landschildkröten erwiesen sich dabei als Salmonella-positiv. Insgesamt wurden 26 verschiedene Salmonella-species bestimmt. Die Verfasser bringen an Hand der Literatur in ihrer Arbeit auch eine Gesamtübersicht über die bisher bei Schildkröten nachgewiesenen Salmonellatypen. Diese Tabelle dürfte zwar nicht mehr vollständig sein, zumal auch Vincent, Neel u. Le Minor[15] eine Anzahl weiterer hier nicht berücksichtigter Typen gefunden haben; sie ist jedoch sehr eindrucksvoll und zeigt, wie groß — vom hohen Befall ganz abgesehen — auch gerade das Spektrum seltener bei Schildkröten vorkommender Salmonella-species ist.

Eigene Untersuchungen

In den Monaten Mai und Juni des Jahres 1959 untersuchten wir einmalig Darminhaltsproben von 198 Schildkröten (testudo graeca), die aus Südost-Bulgarien stammten. Die Proben von 120 dieser Schildkröten waren nach der Sektion dem Dickdarm entnommen und zugleich auf feste Elektivnährböden von Lewin u. Gassner sowie in Anreicherungsbouillon nach Kauffmann direkt geimpft worden. Bei den übrigen 78 Schildkröten entnahmen wir die Proben mit Hilfe von Afterröhren und verbrachten sie in das Anreicherungssubstrat nach Kauffmann. Aus letzterem erfolgten nach 24- und 72stündiger Bebrütung bei 37° C wiederum Aussaaten auf feste Nährböden (Lewin u. Gassner). Die verdächtigen Kolonien wurden nach den zur Identifizierung von Salmonellen allgemein üblichen biochemischen und serologischen Methoden untersucht. Bei diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß 111 Schildkröten oder 56% Träger von Salmonellen waren. Es wurden 119 Salmonella-Kulturen isoliert, von denen eine in R-Form vorlag, weshalb sie sich serologisch nicht genau bestimmen ließ. Auf Veranlassung von Herrn Prof. Kauffmann, dem Leiter der Internationalen Salmonella-Zentrale, wurde die genaue biochemische und serologische Differenzierung der isolierten Kulturen in der Salmonella-Zentrale in Hamburg vorgenommen, wobei die in nachstehender Tabelle aufgeführten Salmonella-species festgestellt werden konnten:

Außer diesen Salmonella-species konnte in einem Falle eine diphasische Arizonakultur = 9a, b : 26 : 21 und in zwei weiteren Fällen

Tabelle

O-Gruppe	Salmonella-species	Anzahl
B	S. bispebjerg = 4, 12 : a : e, n, x	3
	S. bispebjerg = 4, 5, 12 : a : e, n, x	3
	S. paratyphi B (monophas.) = 4, 5, 12 : b : —	1
	S. abony = 4, 5, 12 : b : e, n, x	8
C_1	Salmonella (monophas.) = 6, 7 : a : —	1
	S. richmond = 6, 7 : y : 1, 2	2
	S. mikawasima = 6, 7 : y : e, n, z_{15}	12
C_2	S. newport = 6, 8 : e, h : 1, 2	3
	S. kottbus = 6, 8 : e, h : 1, 5	1
	S. glostrup = 6, 8 : z_{10} : e, n, z_{15}	1
D_1	S. canastel = 9, 12 : z_{29} : 1, 5	3
H	Salmonella = 6, 14 : d : e, n, x	4
I	S. weston = 16 : e, h : z_6	2
	S. salford var. maritza = 16 : l, v : e, n, x	24
J	S. hillbrow = 17 : b : e, n, x, z_{15}	24
M	S. patience = 28 : d : e, n, z_{15}	3
	S. nashua = 28 : l, v : e, n, z_{15}	1
Q	S. hofit = 39 : i : 1, 5	1
T	S. uphill = 42 : b : e, n, x, z_{15}	10
	S. detroit = 42 : z : 1, 5	11
	Salmonella (serolog. nicht bestimmbare R-Form)	1
		119

eine unbewegliche Arizonakultur = 18 (O-Form) nachgewiesen werden*. An und für sich wäre es gerechtfertigt gewesen, auch diese beiden species in der Tabelle aufzuführen, zumal KAUFFMANN in einer kürzlich erschienenen Arbeit vorschlägt[4], die Arizonagruppe eventuell als subgenus III des genus Salmonella zu betrachten. Zwischen Salmonella und Arizona bestehen sehr nahe biochemische und serologische Beziehungen, die ihre Vereinigung zweckmäßig erscheinen lassen. So ist es z. B. ohne weiteres möglich, den größten Teil der Arizona-O- und -H-Antigene mit Salmonellaseren zu bestimmen.

Das konnte auch an Hand der beiden aus Schildkröten von uns nachgewiesenen Arizona-species 9a, b : 26 : 21 und O-18 (unbeweglich) demonstriert werden: das Antigen 9a, b agglutinierte im Salmonellaserum O 50 von S. greenside, die Arizona-H-Phase 21 im H-z_{35}-Serum von S. cairina. Lediglich das Antigen 26 konnte nur

* Für die Überprüfung und Bestätigung der Seroformeln danken wir auch an dieser Stelle Herrn Dr. P. R. EDWARDS (Atlanta, Georgia) vielmals.

mit einem entsprechenden Arizona-H-Serum bestimmt werden. Die unbewegliche Arizonakultur O-18 wiederum agglutinierte auch im O-Serum 13, 22 (bzw. 22 absorb.) von S. poona. In diesem Zusammenhang sei nochmals auf Kauffmanns biochemische Unterteilung des genus Salmonella in drei sub-genera hingewiesen[4,5].

Die im sub-genus I zusammengefaßte Hauptmasse der Salmonella-species, die auch als typische Salmonellen bezeichnet werden, spaltet grundsätzlich Dulcit und d-Tartrat prompt, greift dagegen Natrium-Malonat nicht an und verflüssigt nicht Gelatine. Die heute ca. 60 Salmonella-species, die zum sub-genus II gehören, das eine Art von Zwischenstellung zwischen den typischen Salmonellen und den Arizonakulturen (= sub-genus III) einnimmt, spalten ebenfalls Dulcit, greifen aber d-Tartrat nicht bzw. verspätet oder unregelmäßig an, sind Malonat-positiv und verflüssigen Gelatine. Arizonakulturen (sub-genus III) verhalten sich in d-Tartrat, Natrium-Malonat und Gelatine genau so wie sub-genus II, unterscheiden sich aber von Salmonellakulturen biochemisch durch die negative Dulcit-Reaktion sowie eine häufig erst nach einigen Tagen eintretende Lactosespaltung.

Hervorzuheben ist der beinahe ausschließliche Nachweis der meisten Arizona-species bei Schlangen oder Eidechsen. Bei unseren Untersuchungen von Schildkröten ist nicht nur ebenfalls die Feststellung von Arizonakulturen bemerkenswert, sondern auch die mehrerer Salmonella-species von sub-genus II, das biochemisch eine Brücke zur Arizonagruppe bildet. So handelt es sich bei den in der Tabelle aufgeführten vier Typen: S. canastel, S. hillbrow, S. uphill und S. detroit, die auch in der bakteriologische Untersuchungen von Schildkröten betreffenden Literatur eine gewisse Rolle spielen, um charakteristische Vertreter von sub-genus II.

Weiter sei erwähnt, daß wir, wie aus der Tabelle zu ersehen ist, zwei serologisch verschiedene Bispebjergtypen identifizierten, die durch das Fehlen bzw. Vorhandensein des O-5-Antigens gekennzeichnet waren. Zwei Salmonella-species wurden in der Tabelle nur mit Formeln angegeben: der monophasische Typ Salmonella 6,7 : a : —, der Indol-positiv ist, Inosit erst nach 4 Tagen spaltet und auch die organischen Säuren mit Ausnahme von Mukat erst nach 2—3 Tagen angreift, soll nach Ansicht von Herrn Prof. Kauffmann, dem wir für seine liebenswürdige Kontrolle der Kultur vielmals danken, „nicht als neue species beschrieben werden, da sie zu S. oslo oder zu S. umhlali gehören könnte". Ebenso haben wir davon abgesehen, Salmonella 6,14 : d : e,n,x als S. charity zu bezeichnen, nachdem die Antigenformel von S. charity in 1,6,14,25 : d : e,n,x erweitert und 1959 von Sandbu ein neuer Salmonellatyp: S. lindern[11] — interessanterweise übrigens auch aus einer Schildkröte isoliert — mit der Formel 6,14,24 : d : e,n,x beschrieben wurde. Bei Fehlen der O-Antigene 1,25 bzw. 24 erscheint es sinnvoller, sich mit einer Formelangabe zu begnügen, da das Antigen 6,14 sich in vorliegendem Falle als eine serologische Verlustvariante entweder von S. charity oder von S. lindern, was nicht zu entscheiden ist, auffassen läßt.

Die in unserer Tabelle einmal vertretene S. hofit ist, wie uns Herr Prof. Kauffmann mitteilte, 1958 von Sapiro-Hirsch u. Hirsch[13] ebenfalls aus einer gesunden Schildkröte isoliert und 1958 als neue Salmonella-species beschrieben worden.

Einen besonderen Hinweis verdient die neben S. hillbrow am häufigsten (24mal) gefundene S. salford, bei der es sich um einen besonderen Typ, nämlich die varietas maritza, handelt. Diese varietas wurde in Bulgarien zum erstenmal von Wesselinoff u. Nedelcheva[17] im Jahre 1949 aus einem Kranken isoliert und konnte im Jahre 1950 nochmals bei einem Kranken in der gleichen Ortschaft wie 1949 festgestellt werden. Sie unterscheidet sich von der originalen S. salford-Kultur durch ihr Nichtangreifen von i-Tartrat auch nach 14 Tagen und das negative Verhalten in Sterns Glycerin-Fuchsin-Bouillon. (Die originale S. salford-Kultur ist i-Tartrat + [2,3], Stern ++.) Außerdem bestehen noch geringfügige serologische Abweichungen hinsichtlich der ersten H-Phase (l, v), die, wie Kreuzabsorptionen zeigten, bei den beiden Typen nicht ganz identisch ist[6], doch kommt den serologischen Besonderheiten in der praktischen Diagnostik, in der die Feststellung der erwähnten biochemischen Unterschiede genügt, keine Bedeutung zu. In der eingangs erwähnten Publikation von Kiesewalter, Rudat u. Seidel[7] steht der Typ Salford mit 52 Nachweisen gleichfalls zahlenmäßig weit an der Spitze. Dies ist interessant, da auch ihre Befunde bei griechischen Landschildkröten aus Albanien erhoben wurden. In der Arbeit wird zwar nicht ausdrücklich betont, daß es sich um den Maritzatyp handelt. Auf Grund der Provenienz der untersuchten Tiere und angesichts unserer eigenen Ergebnisse läßt sich dieses aber mit großer Wahrscheinlichkeit vermuten.

Besondere Erwähnung verdient, daß wir in Übereinstimmung mit entsprechenden Hinweisen aus der Literatur[15] ebenfalls bei den Schildkröten häufig einen multiplen Salmonellabefall feststellen konnten. So isolierten wir aus acht Schildkröten gleichzeitig zwei verschiedene Salmonella-species. Zwei Tiere waren Träger von S. hillbrow und S. detroit. Bei den übrigen sechs fanden sich Mischkulturen von S. nashua + S. detroit, Salmonella 6,14 : d : e,n,x + S. detroit. S. paratyphi B + S. richmond, Salmonella 6,7 : a : — + S. uphill, S. mikawasima + S. weston und schließlich S. salford var. maritza + S. hillbrow. Abschließend sei bemerkt, daß auch der zu Beginn dieses Berichts einige Male erwähnte Salmonella-ähnliche Stamm 4,12 : b : —, der Salicin nach 1—2 Tagen spaltet, Gelatine verflüssigt und im KCN-Substrat wächst*, von uns in sechs Fällen nachgewiesen wurde. 1951 war ein ähnlicher Stamm von Boycott, Taylor u. Douglas aus einer Schildkröte und einem kranken Kind (als Paracoli 1385/51) beschrieben worden[1]. Eine zweite solche Isolierung gelang Ludkin (1955) aus zwei Personen und einer Schildkröte. Eine dieser Personen hatte eine Darmerkrankung. Thomas (1957) wies die ätiologische Rolle dieses Stammes bei Enteritiserkrankungen des Menschen nach, denn er isolierte[14] ihn aus einem kranken Kind und der Schildkröte, mit der dieses gespielt hatte. Im

* Dieser Typ ist infolge seiner anomalen fermentativen Eigenschaften aus der Salmonellagruppe ausgeschlossen worden.

Sommer 1957 züchteten Wesselinoff u. Dimow aus dem Darminhalt eines Igels eine Kultur mit den gleichen serologischen und biochemischen Eigenschaften und beschrieben sie als einen Salmonella-ähnlichen Stamm „Sofia“[16]. Auch Vincent, Neel u. Le Minor berichteten 1960, worauf wir bereits hinwiesen, über den dreimaligen Nachweis eines solchen Typs bei Schildkröten[15].

Besprechung

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bestätigen die von Boycott u. Mitarb. erhaltenen Resultate bezüglich des hochgradigen Salmonellabefalls von testudo graeca. Der von uns gefundene niedrigere Prozentsatz (56%) kann davon herrühren, daß nur einmal Proben zur Untersuchung entnommen worden waren. Außerdem wurde der größere Teil der anfänglichen Untersuchungen außerhalb des Laboratoriums vorgenommen, d. h. unter Bedingungen, unter denen die Möglichkeiten zur Überprüfung mehrerer Kolonien, die Verdacht erregen, begrenzt sind.

Boycott u. Mitarb., die 13 Schildkröten einer großen aus Marokko stammenden Sendung untersuchten, nahmen an, daß sich die Tiere während des Transports bei einigen Schildkröten, die Salmonellaträger waren, infiziert hatten. Dadurch ließe sich auch deren große Sterblichkeit (25%) während des Transportes bis zu einem gewissen Grade erklären.

Unter den Verhältnissen, die wir vorfanden, waren die Möglichkeiten einer gegenseitigen Ansteckung der Schildkröten auf ein Mindestmaß herabgesetzt, da die Untersuchungen nur an kleinen Gruppen und an dem Fundort vorgenommen wurden. Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß der Nachweis von Salmonellen bei testudo graeca keinen Zufallsbefund darstellt. In dieser Richtung sowie auch bezüglich der Rolle, welche Schildkröten bei der Epidemiologie menschlicher Salmonellosen spielen können, werden unsere Untersuchungen fortgesetzt.

Zusammenfassung

Bei der Untersuchung des Darminhalts von 198 Schildkröten (testudo graeca) wurden bei 111 Tieren (56%) Salmonellabakterien festgestellt. Von den 119 isolierten Salmonellakulturen lag eine in R-Form vor, während die übrigen verschiedenen Salmonella-species angehörten.

Isoliert wurden ferner zwei Arizonatypen (9a, b : 26 : 21 und O 18, unbeweglich) und sechs Salmonella-ähnliche Bakterienstämme mit der Antigenformel 4, 12 : b : —, die Salicin angreifen, Gelatine verflüssigen und im KCN-Substrat wachsen.

Da die Untersuchungen an kleinen Gruppen und am Fundort vorgenommen wurden, war die Möglichkeit gegenseitiger Ansteckung der

Schildkröten nach ihrem Einfangen auf ein Mindestmaß herabgesetzt. Der große Salmonellabefall von testudo graeca gibt keinen Anlaß zu der Vermutung, daß das Auffinden von Salmonellen bei diesen Tieren eine Zufallserscheinung ist.

Literatur

[1] Boycott, J. A., J. Taylor and S. H. Douglas: Salmonella in tortoises. J. Path. Bact. **65**, 401 (1953).

[2] Buxton, A.: Salmonellosis in Animals. Fornham Royal Bucks England (1957).

[3] Douglas, S. A., and J. Taylor: Monthly Bull. Minist. Hlth Lab. Serv. **13**, 158 1954. (Brieflich von W. Wesselinoff mitgeteilt.)

[4] Kauffmann, F.: Two biochemical sub-divisions of the genus Salmonella. Acta path. microbiol. scand. **49**, 393 (1960).

[5] Kauffmann, F.: Die Bakteriologie der Salmonella-species. Kopenhagen: Munksgaard 1961.

[6] Kauffmann, F.: Briefliche Mitteilung.

[7] Kiesewalter, J., K. D. Rudat u. G. Seidel: Salmonellen aus Reptilien. I. Mitteilung: Untersuchungen an Schildkröten. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **180**, 503—509 (1960).

[8] Klein, H., u. Th. Thur: Salmonella 3,10 : 1,z_{28} : e,n,x, ein neuer Salmonella-Typ. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **168**, 482 (1957).

[9] Le Minor, L., M. A. Fife et P. R. Edwards: Recherches sur les Salmonella et Arizona hébergées par les vipères de France. Ann. Inst. Pasteur **95**, 326—333 (1958).

[10] Mille, R., L. Le Minor et M. Capponi: Nouvelle contribution à l'étude des Salmonella du centre et du Sud Viet-Nam. Recherches chez le lézards. Bull. soc. Path. exot. **51**, 198—203 (1958).

[11] Sandbu, P.: A new Salmonella type: Salmonella lindern 6,14,24 : d : e,n,x. Acta path. microbiol. scand. **46**, 368 (1959).

[12] Sandbu, P., and K. Bövre: A new Salmonella type: Salmonella adamstua = 11 : e,h : 1,6. Acta path. microbiol. scand. **45**, Nr. 3, 319 (1959).

[13] Sapiro-Hirsch, R., u. W. Hirsch: Acta med. orient. (Tel-Aviv) **17**, 80—81 (1958). (Brieflich von F. Kauffmann mitgeteilt.)

[14] Thomas, E. M.: Monthly Bull. Minist. Hlth Lab. Serv. **16**, 29 (1957). (Brieflich von W. Wesselinoff mitgeteilt.)

[15] Vincent, J., R. Neel et L. Le Minor: Les Salmonella des tortues. Contribution à l'étude des du Maroc. Arch. Inst. Pasteur Tunis **37**, 187—194 (1960).

[16] Wesselinoff, W., u. I. Dimow: Über einen Salmonella-ähnlichen Stamm. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **172**, 65—68 (1958).

[17] Wesselinoff, W., u. W. Nedelchewa: Works of the Republ. Inst. of Epidemiol. and Microbiol. T. **1**, 195 (1953). (Brieflich von W. Wesselinoff mitgeteilt.)

[18] Wittig, H., F. Sulzbacher u. H. P. R. Seeliger: Ein neuer Salmonella-Typ: S. halle (mit Hinweis auf die Schildkröte als Salmonella-Reservoir.) Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **173**, 159—160 (1958).

[19] Zwart, P.: Salmonella and Arizona infections in reptiles in the Netherlands. Antonie v. Leeuwenhoek **26**, 250—254 (1960).

McNeil und Hinshaw sind nach Boycott u. Mitarb. zitiert [1], Bruner und Moran nach Buxton[2].

Dr. I. Dimow, Sofia IV, ul. San Stefano 27, A
Dr. W. Wesselinoff, Sofia, ul. Klokotnitza 73
Dr. R. Rohde, Hamburg 36, Gorch Fock-Wall 15—17

Zeitschrift f. Hygiene 148, 142—151 (1961)

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk)

Untersuchungen über das Hämolysin des Corynebacterium (C.) pyogenes und seiner atypischen Variante

Von
H. Hartwigk

(Eingegangen am 15. August 1961)

Lovell[2] hat nachgewiesen, daß das β-Hämolysin des C. pyogenes echte Eigenschaften eines Hämotoxins besitzt. Es hämolysierte in vitro nicht nur rote Blutkörperchen verschiedener Tierarten, sondern rief auch bei weißen Mäusen nach i.v. Injektion einen toxischen Tod hervor und wirkte, Kaninchen und Meerschweinchen in die Haut appliziert, nekrotisierend. Ob andere β-hämolytische Keime der Cornyebacteriaceae ähnliche Hämotoxine zu produzieren vermögen, wurde nicht geprüft.

Lovell gewann das Hämotoxin anfangs (1937) dadurch, daß er die Pyogenesbakterien auf einer mit Paraffin überschichteten Fleischbrühe 48 Std lang kultivierte. Das von den Keimen befreite Filtrat ließ sich mit antitoxischen Kaninchenseren neutralisieren, es verlor an toxischer Aktivität weder durch Aufbewahrung noch durch Konservierung mit Formalin. Die hämolytische Aktivität war durch Titrierung gegenüber einer 1%igen Suspension gewaschener Kaninchenerythrocyten besonders gut feststellbar und konnte durch einstündiges Einwirkenlassen eines antitoxischen Serums im Wasserbad bei 37° C aufgehoben werden.

Mit einem Nährsubstrat, das aus Ochsenherzbouillon (p_H 7,5) und zerkleinertem Rindfleisch bestand, gelang es Lovell, später (1941) eine höhere Toxinausbeute zu erzielen. Das Toxin wurde mit Ammonsulfat (zwei Teile einer gesättigten Lösung auf ein Teil des Filtrates) ausgefällt und das Präcipitat mit Aqua dest. in einer Menge von einem Fünftel des Originalvolumens gelöst und getrocknet.

Ein durch Formolzusatz gewonnenes Toxoid wurde mit Aluminiumhydroxyd präzipitiert, um mit diesem Kaninchen zu immunisieren und ein wirksames antitoxisches Serum herzustellen. Weitere Bemühungen (1949) galten der Trennung der toxischen von der hämolytischen Aktivität, und zwar durch Titrierung an Mäusen (i.v. Injektion) sowie Meerschweinchen und Kaninchen (Hautnekrosetest) einerseits und Prüfung im Hämolysetest andererseits. Hämolytische und toxische Eigenschaft waren aber so eng miteinander gekoppelt, daß jede Eigenschaft für sich nicht untersucht werden konnte.

Eigene Versuche

Unser Ziel war, durch Neutralisationsversuche im Hämolysetest zu prüfen, ob Unterschiede zwischen den Toxinen der typischen und atypischen Variante des C. pyogenes[1] bestanden. Bei abweichenden Ergebnissen mit einzelnen Stämmen der gleichen Variante sollte der Neutralisationstest zur Differenzierung der Stämme benutzt werden. Schließlich interessierte zu erfahren, ob andere Genera der Corynebakteriaceae wie Listeria monocytogenes, Erysipelothrix muriseptica und C. pseudotuberculosis ähnlich wirkende Toxine wie das C. pyogenes zu erzeugen vermochten. Der Staphylokokkenstamm SG 511, dessen Hämolysinbildung Ritzerfeld u. Mitarb.[3] im Reagensglasversuch prüften, wurde ebenfalls in die Versuche einbezogen.

Material

Es wurden untersucht: 1. Elf Stämme der typischen Variante des C. pyogenes (β-hämolytisch, gelatinasepositiv, lackmusmilchpeptonisierend). Zehn Stämme (C 56, J 3, J 7, XIII/5, X/8, 1024, I/2, A/8, A/20, A/10b) waren vom Rinde, ein Stamm (1057) aus Mastitismaterial eines Schweines isoliert.

2. Sechs Stämme der atypischen Variante (β-hämolytisch, gelatinasenegativ, Gerinnung oder Nichtgerinnung von Lackmusmilch ohne Peptonisierung) G 11, 934, A/9, A/10a, A/14 und A/16. Alle mit A bezeichneten Stämme waren aus Tonsillen von Schlachtrindern isoliert worden.

3. Vier Stämme von Listeria monocytogenes (Paterson-Typen 1—4), zwei Stämme von Erysipelothrix muriseptica (256, 1160), ein Stamm von C. pseudotuberculosis ovis (181) und ein Stamm von Staphylococcus aureus (SG 511).

Die zu den Versuchen verwendeten Kaninchen und Mäuse waren aus eigener Zucht und frei von Krankheiten.

Technik

Gewinnung des Hämotoxins

Die Pyogenesstämme wurden nach Isolierung auf Serumagar gehalten und in vierwöchigen Intervallen auf frische Nährböden passagiert. Vor Beginn der Versuche wurden eine Prüfung auf Reinheit und eine Aktivierung auf Frischblutagar vorgenommen. Die Beimpfung der Lovellschen Rinderherz-Fleischnährbrühe geschah mittels Öse, und zwar von der Frischblutagarplatte aus unter Verwendung möglichst gleichgroßer Inocula.

Der Lovellsche Nährboden wurde folgendermaßen hergestellt: 1500 g frisches, mit dem Messer zerkleinertes Rinderherz wurde mit 1000 ml Aqua dest. 2 Std bei 1,2 Atü im Autoklaven gekocht und nach Filtration durch Faltenfilter auf Kolben abgefüllt, die dann im Dampftopf je 1 Std an zwei aufeinanderfolgenden Tagen sterilisiert wurden.

Zu 333 ml des Rinderherzwassers kamen 660 ml Aqua dest., 10 g Pepton (Brunnengräber), 3 g NaCl und 1,3 g sekundäres Natriumphosphat. Nach Einstellung auf p_H 7,6 wurde die Herzwassernährbouillon je 1 Std an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf sterilisiert.

Die Bouillon wurde in einer Menge von 44 ml in 100 ml Erlenmeyer-Kolben abgefüllt und zu jedem Kolben 12 g eines mit der mittleren Scheibe eines Fleischwolfes zerkleinerten mageren Rindfleisches zugegeben. Es schloß sich eine Sterilisierung im Autoklaven bei 1,5 Atü 1 Std lang an und wurde vor Beimpfung eine 24stündige Probebebrütung bei 37,5° C durchgeführt.

Nach Beimpfung wurden die Kolben 72 Std lang bebrütet, eine Dauer, die sich für die Hämotoxinausbeute als optimal erwies. Der Versuch, andere einfachere flüssige Nährböden an die Stelle des Lovellschen Substrates zu setzen, wurde aufgegeben, da die Toxinausbeute weit geringer als im Lovellschen Nährsubstrat war. Nach Prüfung auf Reinheit wurde die Kultur zunächst durch Mullgaze und anschließend durch Seitz-Filter (EK-Größe 3) mit Saugdruck (Wasserstrahlpumpe) filtriert. Das auf Sterilität geprüfte Filtrat wurde in Spitzröhrchen pipettiert, um es sofort oder nach 18stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank (+ 5° C) im Hämolyse- und Neutralisationstest auszuwerten.

Bei Aufbewahrung der nicht filtrierten 72stündigen Kultur bei + 5° C kam es schon innerhalb 24 Std zu einem starken Abfall der hämolytischen Aktivität.

Gewinnung der antibakteriellen und antitoxischen Immunseren

Mit dem Stamm C 56 (typische Variante) wurden zwei ausgewachsene Kaninchen in der Weise immunisiert, daß sie fünfmal mit gewaschenen und 0,3%igem Formol abgetöteten Bakterien i.v. gespritzt wurden. Die Keime wurden in 4,5 ml Traubenzuckerbouillon 24 Std lang bei CO_2-haltiger Atmosphäre in Spitzröhrchen bebrütet, dann zentrifugiert und zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen. Von jedem Röhrchen wurde der Bodensatz in 1 ml Formol-Kochsalz-Lösung (0,3% Formalin) aufgenommen, um in zwei- bis dreitägigen Abständen Mengen von 2,0, 2,5 und dreimal 3,0 ml i.v. zu injizieren. 8 Tage nach der letzten Einspritzung erfolgte dann eine zweimalige i.v. Injektion von je 3,0 ml einer mit NaCl hergestellten Suspension lebender Keime im Abstand von 3 Tagen. 14 Tage nach der letzten Einspritzung wurden die Kaninchen entblutet.

Bei dem Stamm 934 (atypische Variante) wurden die Keimmengen wie vorher gewonnen, jedoch ausschließlich ohne Formol suspendiert, also lebend verimpft. Innerhalb 21 Tagen folgten zehn Injektionen mit je 2,0, 2,5 und später ausschließlich 3,0 ml Bakterienaufschwemmung in zweitägigen Intervallen aufeinander. Entblutung 14 Tage nach der letzten Einspritzung.

Zur Gewinnung der antitoxischen Seren wurden Filtrate der Stämme C 56, J 3 (typ.) und G 11 und 934 (atyp.) in einer Menge von 2,0 und 2,5 ml in zwei- bis dreitägigen Abständen an je einem Kaninchen pro Stamm i.v. appliziert. Bei den Stämmen G 11 und 934 genügten zehn Injektionen innerhalb 20 Tagen zur Erzielung eines ausreichenden Neutralisationstiters, bei den Stämmen C 56 und J 3 mußten die Tiere noch dreimal mit je 3,0 ml Suspension nachgespritzt werden, bis sie den gleichen Titer erreicht hatten.

Antibakterielle und antitoxische Seren wurden in 1 ml Ampullen wenige Tage nach der Gewinnung lyophilisiert, um zu allen Testversuchen frisch gelöste Seren verwenden zu können.

Hämolyse- und Neutralisationstest

Mit je 0,25 ml NaCl wurden 15 Agglutinationsröhrchen beschickt. In das erste Röhrchen wurde 0,25 ml Kulturfiltrat pipettiert. Es erfolgte

dann nach guter Durchmischung ein Weiterpipettieren von 0,25 ml in das nächste Röhrchen und von diesem wieder in das folgende und so fort. Aus dem 14. Röhrchen wurden 0,25 ml der Filtratverdünnung verworfen, während im 15. Röhrchen als Kontrolle 0,25 ml NaCl verblieben. Zu jedem Röhrchen kamen dann 0,25 ml einer 1%igen Suspension zweimal gewaschener Kaninchenerythrocyten, so daß die Filtratverdünnungen 1 : 2, 1 : 4 bis 1 : 16.384 entstanden. Nach leichtem Hin- und Herschwenken des Gestelles schloß sich eine einstündige Aufbewahrung im Wasserbad bei 37,5° C an, wonach die Ergebnisse abgelesen wurden. Eine bis zu 18 Std ausgedehnte Aufbewahrung der Röhrchen bei 20° C wurde anfangs versucht, später aber nicht mehr durchgeführt, weil die Ergebnisse sich nicht wesentlich änderten, d. h. die Titer meist um eine halbe oder eine Stufe höher lagen als vorher. Als Endpunkt wurde diejenige Filtratverdünnung angesehen, in der etwa noch die Hälfte der Erythrocyten gelöst war (++). Eine völlige Lösung entsprach einer +++++ = Reaktion. Bei negativer Reaktion (−) war die überstehende Flüssigkeit völlig klar und der Blutkörperchenbodensatz in der Kuppe des Röhrchens scharf abgesetzt.

Für den *Neutralisationstest* wurde als Arbeitstiter des Toxinfiltrates die vierfache Dosis des Endtiters verwendet. 16 Röhrchen wurden mit 0,25 NaCl beschickt. In das erste Röhrchen wurde 0,25 ml des antibakteriellen oder antitoxischen Serums gegeben, um nach guter Durchmischung 0,25 ml auf das nächste Röhrchen und von diesem wieder 0,25 ml auf das folgende und so fort weiter zu übertragen. Aus dem 15. Röhrchen wurden 0,25 ml Serumverdünnung verworfen. In das 16. Röhrchen wurde 0,25 ml eines 1 : 5 verdünnten normalen Kaninchenserums titriert. Nach Durchmischung wurden 0,25 ml der Serumverdünnung verworfen. Dieses Röhrchen diente als Kontrolle. Schließlich wurden zu allen Röhrchen 0,25 ml der Arbeitsverdünnung des Toxinfiltrates hinzugegeben und die Röhrchen nach sorgfältigem Schütteln des Gestelles im Wasserbad bei 37,5° C 1 Std lang aufbewahrt. Nach Ablauf des Wasserbadaufenthaltes wurden 0,25 ml einer 1%igen Kaninchen-Erythrocytensuspension zupipettiert und das Gestell nach leichtem Hin- und Herbewegen wieder 1 Std lang in das Wasserbad gestellt.

Bei der Titerberechnung für das Serum wurde die durch Zugabe des Filtrates bewirkte Verdünnung mit berücksichtigt, so daß die geometrische Verdünnungsreihe bei 1:2 begann und bei 1:32.768 (15. Röhrchen) aufhörte. Als Endtiter galt die Verdünnung, bei der die Hämolyse bei etwa der Hälfte der Erythrocyten (++) ausgeblieben war. Die +++++ = Reaktion war durch einen klaren Überstand und einen scharf abgesetzten Bodensatz gekennzeichnet. Von der Kontrolle war in jedem Fall zu verlangen, daß eine völlige Hämolyse eingetreten war.

Ergebnisse

Die Hämolysinbildung schien bei dem C. pyogenes im wesentlichen eine Eigenschaft der Vermehrungstendenz des einzelnen Stammes zu sein. Immerhin blieben manche Stämme trotz mehrfach wiederholter Filtratgewinnung nur verhältnismäßig schwache Hämolysinbildner, während andere Stämme von vornherein viel Hämolysin produzierten und diese Eigenschaft auch bei wiederholter Kulturfiltratgewinnung beibehielten. Unterschiedliche Hämolysintiter kamen allerdings bei den einzelnen Stämmen auch vor, obwohl Filtratgewinnung und -titrierung möglichst gleichartig gehandhabt wurden. Bei zwei- bis viermal durchgeführten Filtratgewinnungen und Titrierungen kam es bei den untersuchten Stämmen zu folgenden Hämolysetitern (im Nenner als reziproke Titer angegeben).

Typische Stämme:

C 56	J 3	J 7	XIII 5	X 8	1024	T/2	A/8	A/10b	A/20	1057
32/64	128/512	512	1024	64	128	16	64	256	512	64/128

Atypische Stämme:

G 11	934	A/9	A/10a	A/14	A/16
1024	1024/4096	1024	1024	128	256

Das arithmetische Mittel der Titer lag bei den typischen Stämmen mit 298 erheblich niedriger als bei den atypischen (1258,6). Daß die atypischen Stämme aber nicht ausschließlich starke Hämolysinbildner waren, zeigte der Stamm A/14 (Titer 1 : 128).

Mit den Listerien der Paterson-Typen war mit der gleichen Kultur- und Titriermethode kein Hämolysin nachweisbar. Gleiches war der Fall bei den Stämmen 256 und 1160 der E. muriseptica und dem C. pseudotuberculosis ovis 181. Eine kürzere oder längere Bebrütungszeit änderte nichts an dem Ergebnis. Auch blieb eine Hämolysinwirkung bei roten Blutkörperchen anderer Tierarten (Schafen, Hühnern) aus. Aus dieser Feststellung läßt sich wohl schließen, daß in den biologischen Eigenschaften der Hämolysine des C. pyogenes und anderer Genera der Corynebacteriaceae erhebliche Unterschiede bestehen dürften und der β-hämolytische Hof um die auf der Blutplatte gewachsene Kolonie nur wenig über die Art des Hämolysins auszusagen vermag.

Lediglich der als alpha-Hämolysinbildner bekannte Staphylokokkenstamm SG 511 erreichte bei gleicher Filtratgewinnung und -titrierung einen Titer von 1 : 16.

Um über das Hämolysin des C. pyogenes weiteres zu erfahren, prüften wir zunächst die Frage der Haltbarkeit, indem wir die Filtrate der Stämme J 3 (typ.) und G 11 (atyp.) bei + 5° C (K) und — 24° C (G) bis zu 46 Tagen aufbewahrten und in verschiedenen Zeitabständen auf Hämolysinwirkung untersuchten. Das Ergebnis zeigt Tab. 1.

Die Titrierungen wurden bei Steigerungen oder Verminderungen der Titer öfters wiederholt, ohne daß sich die Ergebnisse wesentlich änderten. Wenn auch das Absinken der Titer durch gelegentliche Remissionen

Tabelle 1. *Reziproke Hämolysintiter (H-Titer) der Stämme J 3 und G 11 bei Aufbewahrung im Kühlschrank (K) und in der Gefriertruhe (G)*

Aufbewahrungszeit in Tagen	St. J 3		St. G 11	
	K	G	K	G
0	256		1024	
3	128	128	512	512
7	64	64	512	256
12	128	256	512	512
18	64	64	512	512
23	64	64	512	512
30	128	64	512	1024
37	64	128	512	256
41	64	64	256	256
46	128	64	256	256

Tabelle 2

H-Titer nach halbstündiger Aufbewahrung bei verschiedenen Temperaturen

Stämme		37,5°	40°	56°	60°	65°
C 56	typ.	1 : 64	1 : 16	0	0	0
J 3	typ.	1 : 128	1 : 64	0	0	0
1057	typ.	1 : 128	1 : 64	0	0	0
G 11	atyp.	1 : 1024	1 : 512	0	0	0
934	atyp.	1 : 1024	1 : 512	0	0	0

nicht kontinuierlich war, glauben wir doch annehmen zu sollen, daß ein geringer Wirksamkeitsabfall sowohl bei Aufbewahrung im Kühlschrank als auch in der Gefriertruhe eintrat. Die unvermittelt eingetretenen Titeranstiege vermögen wir uns nur durch technische Unzulänglichkeiten bei der Filtratverdünnung und -abmessung zu erklären. Die Filtrate der typischen und atypischen Variante verhielten sich gleich, abgesehen von den höheren Titern des atypischen Stammes.

Der Frage der Temperaturempfindlichkeit des Hämolysins wurde weiterhin nachgegangen. Dabei wurden die Filtrate der Stämme C 56, J 3 und 1057 (typ.) und G 11 und 934 (atyp.) $^1/_2$ Std lang bei 37,5° C, 40° C, 56° C, 60° C und 65° C im Wasserbad aufbewahrt und anschließend untersucht. Die Ergebnisse zeigt Tab. 2.

Die H-Titer der frischen und $^1/_2$ Std lang bei 37,5° C aufbewahrten Filtrate waren gleich hoch. Eine halbstündige Aufbewahrung bei 40° C brachte sowohl bei den typischen als auch bei den atypischen Stämmen eine Titerreduktion, 56° C inaktivierten das Hämolysin von allen fünf Stämmen.

Zur Untersuchung des Einflusses von Formalin auf das Hämolysin wurden an den gleichen Stämmen wie vorher bei 24stündiger Einwirkung bei 37,5° C die Formalinzusätze so gewählt, daß sie im Gesamtvolumen 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 und 0,8% ausmachten. Das Ergebnis der Hämolysintestung zeigt Tab. 3.

Tabelle 3. *H-Titer nach 24stündiger Aufbewahrung der Filtrate bei 37,5° C ohne und mit Formalinzusätzen*

Stämme		H-Titer des frisch hergestellten Filtrats	ohne Formalin	mit Formalin				
				0,1	0,2	0,3	0,5	0,8%
C 56	typ.	1 : 64	1 : 64	1 : 64	1 : 16	1 : 8	1 : 8	0
J 3	typ.	1 : 128	1 : 64	1 : 64	1 : 32	1 : 4	1 : 4	0
1057	typ.	1 : 128	1 : 128	1 : 64	1 : 32	1 : 16	1 : 8	1 : 2
G 11	atyp.	1 : 1024	1 : 512	1 : 256	1 : 256	1 : 128	1 : 16	1 : 8
934	atyp.	1 : 1024	1 : 512	1 : 256	1 : 64	1 : 4	1 : 4	0

Eine 24stündige Aufbewahrung bei 37,5° C ohne Formalinzusatz bewirkte bei drei von fünf Stämmen eine geringe Titerverminderung, die noch verstärkt war, wenn die Aufbewahrung mit 0,1% Formalin erfolgte. Bei steigendem Formalingehalt kam es zu weiteren Titerverlusten. 0,3% Formalin hatte bereits einen ausgeprägten reduzierenden Einfluß. Die Filtrate der Stämme 1057 (typ.) vom Schwein und G 11 (atyp.) erwiesen sich formalinresistenter als die Filtrate der übrigen Stämme. Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen typischen und atypischen Stämmen war aber nicht erkennbar.

Zur Neutralisation standen folgende Seren zur Verfügung: 1. die antibakteriellen Seren C 56 und 934; 2. die antitoxischen Seren C 56, J 3, G 11 und 934.

Beide Serumarten unterschieden sich dadurch, daß die antibakteriellen mit Fullerantigenen positive, die antitoxischen Seren negative Präcipitationen ergaben. Die antitoxischen Seren besaßen ebenso im Gegensatz zu den antibakteriellen Seren keine komplementbindenden Eigenschaften.

Die Ergebnisse der mit den Hämolysinen der 17 Pyogenesstämme durchgeführten Neutralisationsteste sind unter Angabe der reziproken Titer in Tab. 4 zusammengestellt.

Antibakterielle und antitoxische Seren zeigten in ihrer Wirksamkeit bei der Neutralisation mit homologen und heterologen Hämolysinen keine signifikanten Unterschiede. Zwar kam es hier und da bei beiden Serumarten zu Titerdifferenzen um ein oder zwei Titerstufen, die Differenzen traten aber regellos auf und zeigten sich andererseits auch bei gleichen Hämolysinen und verschiedenen Antiseren. Antibakterielle und antitoxische Seren waren für den Neutralisationstest gleich gut geeignet. Diese Tatsache verdient hervorgehoben zu werden, weil die antibakteriellen Seren mit zweimal gewaschenen Vollbakterien, die antitoxischen Seren hingegen mit Bouillonkulturfiltraten gewonnen

worden waren. Ohne Zweifel darin setzen zu wollen, daß das Hämolysin des C. pyogenes ein Ektotoxin ist, zeigt die antitoxische Wirksamkeit der unter Verwendung von gewaschenen Bakterien hergestellten Antiseren, daß das Hämolysin den Bakterienleibern trotz Waschens noch in erheblichen Mengen anhaftet, möglicherweise auch ein Bestandteil des Bacteriums ist.

Der Hämolyse-Neutralisationstest bot keine Handhabe zur Unterscheidung der einzelnen Stämme, weil sich alle Hämolysine der Stämme bei verschiedenen Seren ungefähr gleich verhielten, wenn man von nicht erklärbaren Schwankungen absieht. Es trat vor allem hervor, daß die homologen Titer keineswegs die höchsten waren, vielmehr die heterologen Hämolysine die homologen zuweilen um ein oder zwei, selten sogar um drei Titerstufen übertrafen. Bemerkenswert ist, daß die Hämolysine der typischen und atypischen Pyogenesstämme sich im Neutralisationstest mit heterologen und homologen Seren gleich verhielten, beide Varianten daher in Hinsicht auf ihre β-Hämolysine engstens zusammengehören dürften. Die Spezifität der Hämolyse für das Genus C. pyogenes war

Tabelle 4. *Reziproke Titer des Hämolyse-Neutralisationstestes mit antibakteriellen und antitoxischen Kaninchenseren*

Antiseren von Stämmen	Hämolysine der Stämme																	
	typisch											atypisch						
	C 56	J 3	J 7	XIII/5	X/8	1024	I/2	A/8	A/20	A/10b	1057	G 11	934	A/9	A/10a	A/14	A/16
	Antibakterielle Seren																	
C 56 (typ.)	**2048**	1024	2048	1024	2048	2048	4096	1024	4096	1024	512	1024	512	512	4096	4096	2048
934 (atyp.)	8192	8192	8192	4096	4096	2048	8192	8192	4096	4096	8192	4096	**2048**	2048	2048	4096	16384
	Antitoxische Seren																	
C 56 (typ.)	**2048**	2048	1024	1024	4096	2048	16384	2048	2048	1024	1024	4096	1024	2048	2048	1024	2048
934 (atyp.)	2048	4096	2048	1024	4096	2048	1024	2048	4096	1024	1024	2048	**2048**	1024	2048	1024	8192
G 11 (atyp.)	512	2048	512	4096	2048	1024	4096	2048	8192	1024	512	**4096**	2048	2048	4096	1024	2048
J 3 (typ.)	4096	**8192**	8192	4096	8192	8192	16384	8192	4096	4096	4096	2048	4096	2048	8192	8192	2048

Fettgedruckte Zahlen = Titer bei homologen Hämolysinen.

insbesondere dadurch bewiesen, daß mit den antibakteriellen und antitoxischen Seren das alpha-Hämolysin des Staphylococcus aureus SG 511 nicht neutralisiert werden konnte.

Besprechung

Mit den von Lovell eruierten Verfahren der Gewinnung und Titrierung des β-Hämolysins des C. pyogenes wurden die Hämolysine von elf typischen und sechs atypischen Stämmen dieses Genus untersucht. Es zeigte sich dabei eindeutig, daß alle Stämme ein im Hämolysetest in der Menge und Art bestimmbares Hämolysin bildeten und sich hierdurch von anderen β-hämolytischen Keimen der Familie der Corynebacteriaceae (L. monocytogenes, E. muriseptica, C. pseudotuberculosis ovis) unterschieden. Die Mengen des Hämolysins unterlagen Schwankungen und hingen im wesentlichen von der Wachstumsintensität des einzelnen Stammes ab. Im Vergleich zum Staphylococcus aureus SG 511 war das C. pyogenes ein sehr starker Hämolysinbildner. Zwischen typischen und atypischen Varianten ergaben sich in der Art und Menge des Hämolysins keine Unterschiede. Beide Varianten gehören daher zusammen, wobei das Hämolysin als ein spezifisches Produkt des Genus C. pyogenes aufgefaßt werden kann.

Den atypischen Varianten scheint die Eigenschaft zuzukommen, besonders starke Hämolysinbildner zu sein.

Das Hämolysin büßt bei Aufbewahrung in der unfiltrierten Kulturflüssigkeit bei + 5° C stark an Wirksamkeit ein. Es erleidet auch dann geringe Wirksamkeitsverluste, wenn es als Filtrat bei + 5 und — 20° C längere Zeit aufbewahrt wird. Das Hämolysin ist thermolabil, schon eine halbstündige Erhitzung bei + 40° C bewirkt eine deutliche Titerreduktion, bei 56° C während $^1/_2$ Std kommt es zu einer Inaktivierung. Formalin in einer Konzentration von 0,1% wirkt bei 24stündiger Aufbewahrung bei 37,5° C ebenfalls titerreduzierend. Bei höheren Konzentrationen tritt dies noch stärker in Erscheinung. Eine gewisse Formalinresistenz kam bei einzelnen typischen und atypischen Stämmen insofern vor, als die Hämolysine dieser weniger an Wirksamkeit verloren als die Hämolysine anderer Stämme. Daß Lovell in der Frage der Empfindlichkeit des Hämolysins gegenüber Aufbewahrung und Formalin zu anderen Ergebnissen kam, läßt sich nur dadurch erklären, daß wir mit einer größeren Zahl von Stämmen und hinsichtlich Temperaturen und Formalinkonzentrationen wahrscheinlich unter anderen Bedingungen gearbeitet haben.

Die Neutralisation des Hämolysins der typischen und atypischen Stämme gelingt sowohl mit antibakteriellen als auch mit antitoxischen Seren in relativ hohen Serumverdünnungen. Grundsätzliche Unterschiede ergaben sich jedoch in den Titerhöhen nicht, so daß es nicht

möglich ist, mit dem Neutralisationstest antigene Verschiedenheiten einzelner Stämme nachzuweisen. Der Test ließ aber erkennen, daß die typischen und atypischen Stämme zu einem Genus gehören.

Zusammenfassung

Das C. pyogenes produziert im Gegensatz zu L. monocytogenes, E. muriseptica und C. pseudotuberculosis ovis ein im Hämolysetest nach Lovell titrierbares β-Hämolysin. Das β-Hämolysin wird von der typischen und atypischen Variante gleichermaßen gebildet. Es verliert an Wirksamkeit bei Aufbewahrung und Formalinzusatz (0,1% und mehr) und ist hitzelabil. Die Neutralisation des β-Hämolysins mit antibakteriellen und antitoxischen Antiseren ist für die Differenzierung der Pyogenesstämme nicht geeignet, beweist aber, daß die atypische Variante dem Genus C. pyogenes zuzurechnen ist.

Literatur

[1] Hartwigk, H.: Atypische Merkmale von Corynebacterium (C.) pyogenes beim Rind. Dtsch. tierärztl. Wschr. **68**, 38—41 (1961). — Hartwigk, H., u. S. Grund: Atypische Corynebakterien beim Rind. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **179**, 499 bis 508 (1960).

[2] Lovell, R.: Studies on Corynebacterium pyogenes with special reference to toxin production. J. Path. Bact. **45**, 339—355 (1937). — Studies on toxin of Corynebacterium pyogenes. J. Path. Bact. **52**, 295—303 (1941). — Further studies on the toxin of C. pyogenes. J. Path. Bact. **56**, 525—529 (1944).

[3] Ritzerfeld, W., M. Kienitz u. H. Glodny: Über Beziehungen zwischen Atmungsaktivität, Hämolysinbildung und Enterotoxinproduktion bei Staphylokokken. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 144—157 (1960).

Professor Dr. H. Hartwigk,
Institut für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem, Königin Luise-Straße 49

Zeitschrift f. Hygiene 148, 152—156 (1961)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. W. Brauss)

Über den Einfluß der Streptomycinresistenz auf die Virulenz von Shigellen und Coli-Shigella-Hybriden

Von
Wolfgang Stenzel

(Eingegangen am 4. Oktober 1961)

In einer vorausgegangenen Publikation[11] haben wir kurz auf die Abschwächung der Virulenz von Coli-Shigella-Hybriden nach Übernahme der Streptomycinfestigkeit eines resistenten Esch.-coli-Stammes hingewiesen.

Wir fanden bei diesen Untersuchungen, daß streptomycinfeste Recombinanten aus Konjugationsprozessen zwischen schleimhautpathogenen Shigella-Stämmen bzw. Coli-Shigella-Bastarden und einer streptomycinresistenten Variante von Esch. coli K 12 Hfr C ihre Virulenz ganz oder teilweise eingebüßt hatten, während von 20 im Harnblasen- und Conjunctivaltest geprüften streptomycinsensiblen Bastarden aus Kreuzungen mit einer streptomycinempfindlichen Variante desselben Coli-Stammes alle noch über die Schleimhautpathogenität des Shigella-Mutterstammes verfügten. Völligen Verlust der Schleimhautpathogenität sahen wir weiterhin auch bei an Streptomycin adaptierten Sh. flexneri 3- und Sh. boydii 2-Stämmen.

Um sicherzustellen, daß die Virulenzabschwächung der streptomycinresistenten Hybriden nicht auf der Übertragung anderer Faktoren durch die Coli-S^r-Variante beruhte, nahmen wir in der Folge noch einige Hybridisationsversuche zwischen pathogenen Sh. flexneri 2-, Sh. flexneri 3- und Sh. boydii 11-Stämmen einerseits und der S^r-Variante von Esch. coli K 12 Hfr C andererseits vor, wobei wir aus jeweils demselben Versuchsansatz resistente und sensible Bastarde isolierten und vergleichend auf ihre Schleimhautvirulenz prüften. Möglicherweise bestehende quantitative Beziehungen zwischen Virulenz- und Resistenzgrad wurden durch vergleichende quantitative Sensibilitätsbestimmung untersucht. Weiterhin prüften wir an Hand mehrerer Tierpassagen, inwieweit die Virulenzreduktion streptomycinfester Stämme stabil ist und ob im Zuge solcher Passagen streptomycinsensible Rückmutanten auftreten.

Material und Methoden

Zur Untersuchung kamen streptomycinsensible (S^s) pathogene (P-) und apathogene (p-) Varianten eines Sh. flexneri 3- und eines Sh. boydii 2-Stammes[10], streptomycinadaptierte Abkömmlinge der P-Varianten dieser beiden Stämme, strepto-

mycinresistente (S^r) und -sensible Hybriden aus Kreuzungen von Esch. coli K 12 Hfr C S^r mit pathogenen Stämmen von Sh. flexneri 2, Sh. flexneri 3 und Sh. boydii 11 und streptomycinresistente Bastarde aus Kreuzungen eines sensiblen Coli S^s-Flexner 3-Hybriden (F 3 I_1/II/III_1[11]) mit Esch. coli K 12 Hfr C S^r.

Die Streptomycinadaptation der Shigella-Stämme bewerkstelligten wir durch Passagen über Aminovit-Bouillon mit jeweils verdoppeltem Streptomycinzusatz, beginnend mit einer Konzentration von 0,5 μg Streptomycin/ml bis zu 100 μg Streptomycin/ml in der letzten Stufe: Nach 24stündiger Bebrütung säten wir aus dem bewachsenen Kulturröhrchen auf Endo-Agar aus und beimpften die nächst höher konzentrierte Streptomycin-Bouillon mit einer Öse dichten Kulturmaterials. Da die Zahl der jeweils höher resistenten Spontanmutanten gering ist, sicherte dieses Vorgehen einen rascheren Erfolg als der meist ergebnislose Versuch einer direkten Überimpfung vergleichsweise geringer Keimmengen aus dem bewachsenen Kulturröhrchen.

Aus jeweils vier Führungen isolierten wir so vier streptomycinresistente Flexner 3- und vier resistente Boyd 2-Stämme.

Bei der Darstellung und Isolierung von Coli-Shigella-Hybriden folgten wir den in einer vorausgegangenen Arbeit[11] bereits dargelegten Methoden.

Zur quantitativen Austestung der Streptomycinresistenz wurden Streptomycin-Verdünnungsreihen in Aminovit-Bouillon angesetzt und das jeweils 5 ml fassende Teströhrchen mit einem Tropfen 24stündiger Kulturbouillon beimpft. Nach 24stündiger Bebrütung zeigten alle sensiblen Shigella- und Hybriden-Stämme kritische Wachstums/Hemmungs-Grenzen. Bei Esch. coli Hfr C S^r und seinen resistenten Abkömmlingen ließ sich ein scharfer Grenztiter dagegen nicht erheben: in Streptomycinkonzentrationen, die über 2000 μg/ml lagen, nahm die Bewuchsdichte der Röhrchen zwar deutlich ab, doch war zartes Wachstum noch bei 50000 μg/ml festzustellen. Wir beurteilten den Resistenzgrad der streptomycinresistenten Hybridenstämme daher relativ durch Vergleich der Keimdichten in allen Streptomycinkonzentrationen.

Die Schleimhautpathogenität der Keime bzw. ihr Virulenzgrad wurde an Hand des Bingelschen Harnblasenversuchs[7,9] und der experimentellen Infektion des Meerschweinchenauges[8,13] beurteilt:

Wir instillierten 1 ml 24stündige Kulturbouillon bei weiblichen Meerschweinchen in die vorher entleerte Harnblase und infizierten das gleiche Tier zusätzlich mit einer Öse dichten Kulturmaterials am Auge. Den Virulenzgrad der Keime definierten wir nach folgenden Kriterien:

Grad 1 (geringe Virulenz): Auge symptomfrei, kein oder nur vorübergehendes Einnässen, geringes perivesicales Ödem und/oder vereinzelte Blutungen unter die Harnblasenserosa.

Grad 2 (mäßige Virulenz): leichte Keratitis frühestens 48 Std post infectionem, vorübergehendes Einnässen, mäßiger Harnblasenbefund.

Grad 3 (normale Virulenz): eitrige Keratoconjunctivitis 24—48 Std post infectionem, Nässen bis zum Spontantod oder der Tötung am 5. Tag post infectionem, ausgeprägter pathologisch-anatomischer Harnblasenbefund.

Ergebnisse

Alle acht streptomycinadaptierten Shigella-Stämme erwiesen sich im Tierversuch als apathogen. Bemerkenswert ist hierbei, daß die sensiblen Ausgangsstämme, Sh. flexneri 3 10121/54 und Sh. boydii 2 10607/54, bei früheren Untersuchungen[10] ihre Schleimhautpathogenität erst nach über 100 Nährbodenpassagen einbüßten.

Von fünf nach Hybridisation mit Esch. coli K 12 Hfr C S^r resistent gewordenen Coli S^s-Flexner 3-Bastarden waren drei apathogen, während zwei nur noch geringe Krankheitserscheinungen, entsprechend dem Virulenzgrad 1, auslösten. Der sensible Mutterstamm dieser resistenten Bastarde, der Hybride F3 $I_1/II/III_1$ [11], war dagegen hochvirulent.

Tierversuche mit je zwei streptomycinresistenten und zwei sensiblen Coli S^r-Shigella-Bastarden, die unter vergleichbaren Bedingungen aus dem gleichen Ansatz isoliert wurden, hatten folgendes Ergebnis:

Mutterstamm	*Virulenzgrad der nach folgenden Merkmalen selektierten Hybriden*		
	Lactose +	Xylose +	Streptom. res.
Sh. flexneri 2	2		2
	2		avirulent
Sh. flexneri 3		3	1
		3	avirulent
Sh. boydii 11	3		avirulent
	3		avirulent

Zwei wenig virulente resistente Hybriden (F3 $I_1/II/III_1/IV_1$ und F3 $I_1/II/III_1/IV_2$) passierten wir über drei Meerschweinchen, indem wir mit den 5 Tage post inf. aus der Harnblase angezüchteten Subkulturen jeweils wieder ein neues Versuchstier infizierten. Die Virulenz beider Stämme nahm im Laufe dieser Passagen deutlich zu und entsprach bei den letzten Tieren in etwa Grad 2—3.

Zwischen Resistenzgrad und Virulenzreduktion bestanden keinerlei feste Zusammenhänge: ungeachtet der jeweiligen Virulenz wiesen alle streptomycinempfindlichen Hybriden die Resistenz des Shigella-Mutterstammes, die resistenten diejenige von Esch. coli K 12 Hfr C S^r auf. Auch die durch mehrere Tierpassagen virulenzgesteigerten Bastarde besaßen noch denselben Resistenzgrad wie die Ausgangskulturen. Den spontanen Pathogenitätsverlust der Shigellen fanden wir ebenfalls nicht mit einer Resistenzerhöhung verknüpft: p- und P-Variante der Sh. boydii 2 wuchsen beide bis zu 1 μg Streptomycin/ml und wurden durch 2 μg/ml gehemmt, der P-Stamm von Sh. flexneri 3 wuchs bis zu 1 μg/ml, die entsprechende p-Variante bis zu 2 μg Streptomycin/ml.

Obwohl die Wachstumsgeschwindigkeit der streptomycinresistenten Stämme in der Regel deutlich reduziert war, schien dieser Umstand doch nicht für den Virulenzverlust verantwortlich zu sein. Wachstumsgeschwindigkeit und Virulenz gingen nämlich bei S^r-Hybriden gleicher Herkunft nicht konform, insbesondere fanden wir auch keine Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit im Gefolge der Virulenzerhöhung nach Tierpassagen.

Schließlich konnte auch ein O-Antigen-Defekt als Ursache für den Virulenzverlust der S^r-Bastarde ausgeschlossen werden, denn ein gegen

den Flexner 3-Mutterstamm zweier wenig virulenter bzw. apathogener S^r-Hybriden gerichtetes Serum ließ sich durch Absorption mit den Hybriden-Antigenen vollständig erschöpfen.

Diskussion

Alle Untersuchungen über die Beeinflussung der Virulenz von Shigellen und Shigella-Hybriden durch einen bestimmten Eingriff sind durch den Unsicherheitsfaktor belastet, daß diese Keime ihre Schleimhautpathogenität aus unbekannter Ursache spontan verlieren können. Dieser Umstand ist naturgemäß besonders bei der mit zahlreichen Nährbodenpassagen verknüpften Streptomycinadaptation in Rechnung zu stellen. Wie die regelmäßig erhaltene Pathogenität sensibler Shigella-Bastarde zeigt, ist die Wahrscheinlichkeit für den Eintritt eines spontanen Pathogenitätsverlustes während der bis zur Reinzüchtung der Hybridenstämme ablaufenden Zellteilungen dagegen gering. Man darf somit die Virulenzreduktion zumindest der S^r-Hybridenstämme auf einen spezifischen Effekt der Streptomycinresistenz, d.h. auf den Ausfall streptomycinsensibler Zellstrukturen oder Metabolismen, zurückführen.

Virulenzreduktion nach Einführung von Streptomycinresistenz scheint zwar den Regelfall darzustellen, ist aber offensichtlich nicht obligatorisch und vor allem auch — zumindest bis zu einem gewissen Grade — reversibel. Diese Umstände schließen eine enge Verknüpfung des pathogenetischen Prinzips der Shigellen mit streptomycinsensiblen Stoffwechselmechanismen oder Zellbausteinen aus, vielmehr dürfte die Virulenz indirekt durch die aus der Umgehung der Streptomycinblockade resultierenden Stoffwechselumsteuerungen[1,15] tangiert werden.

Unsere Ergebnisse decken sich in etwa mit den an anderen streptomycinresistenten bzw. -dependenten Bakterien — insbesondere M. tuberculosis — erhobenen Befunden, nach denen die Virulenz solcher Stämme reduziert sein kann[2,4–6], aber nicht sein muß[3,6,12,14,16].

Zusammenfassung

Acht streptomycinresistente Shigella-Stämme erwiesen sich im Conjunctival- und Harnblasentest als avirulent. Von elf Coli-Shigella-Hybriden, in die durch Bastardierung mit einem streptomycinfesten Esch. coli-Stamm Streptomycinfestigkeit eingeführt worden war, hatten sieben ihre Virulenz vollständig und drei teilweise eingebüßt.

Durch Passagen über die Meerschweinchenharnblase ließ sich die Virulenz resistenter Hybridenstämme wieder anheben.

Quantitative Beziehungen zwischen Resistenz- und Virulenzgrad bestanden nicht.

Literatur

[1] Di Marco, A.: Biochemical interpretation of antibiotic resistance of microorganisms. Proc. Fourth Intern. Congress Biochem. 5 (Biochemistry of antibiotics), S. 64. London: Pergamon Press 1959.

[2] Doane, E. A., and E. Bogen: Streptomycin-dependent tubercle bacilli. Amer. Rev. Tuberc. **64**, 192 (1951).

[3] Domagk, G.: Beitrag der experimentellen Forschung zum Problem der Resistenz der Tuberkelbazillen und ihrer Virulenz unter Chemotherapie. Z. Tuberk. **109**, 129 (1956).

[4] Emmart, E. W., W. T. McCloskey, M. I. Smith and J. E. Lieberman: Acquired resistance of M. tuberculosis to Streptomycin in vitro and its behavior in experimental infections. Amer. Rev. Tuberc. **59**, 438 (1949).

[5] Hafner, R., u. P. Ihm: Über das biochemische Verhalten hoch- und normalresistenter Tuberkelbakterien und anderer säurefester Mycobakterien. Arzneimittel-Forsch. **6**, 513 (1956).

[6] Lenert, T. F., and G. L. Hobby: Streptomycin-dependent strains of Mycobacterium tuberculosis. Amer. Rev. Tuberc. **59**, 219 (1949).

[7] Piéchaud, D., et S. Szturm-Rubinstein: Pouvoir pathogène expérimental des bacilles dysentériques chez le cobaye. Ann. Inst. Pasteur **97**, 511 (1959).

[8] Serény, B.: Keratoconjunctivitis shigellosa. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **178**, 325 (1960).

[9] Stenzel, W.: Untersuchungen über die Harnblasenpathogenität einiger Enterobacteriaceen Gruppen im Bingelschen Versuch. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 123 (1960).

[10] Stenzel, W.: Serologische und toxikologische Untersuchungen der Lipopolysaccharide schleimhautpathogener und -apathogener Shigella-Stammpaare. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 391 (1961).

[11] Stenzel, W.: Esch. coli-Shigella-Hybriden und ihre Schleimhautpathogenität. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 521 (1961).

[12] Suter, E., u. W. A. Vischer: Untersuchungen an in vitro gegen Penicillin und Streptomycin resistent gezüchteten Staphylokokken. Schweiz. Z. Path. **11**, 428 (1948).

[13] Szturm-Rubinstein, S., D. Piéchaud et P. Thibault: Inoculation conjonctivale au cobaye de bacilles dysentériques. Ann. Inst. Pasteur **93**, 463 (1957).

[14] Weidmann, S.: Über die Virulenz resistent gewordener Tuberkelbakterien. Klin. Wschr. **33**, 33 (1955).

[15] Williamson, G. M.: The mode of action of streptomycin. J. Pharm. (Lond.) **9**, 433 (1957).

[16] Youmans, G. P., and E. H. Williston: Effect of streptomycin on experimental infections produced in mice with streptomycin resistant strains of M. tuberculosis var. hominis. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **63**, 131 (1946).

Dr. W. Stenzel,
Hygiene-Institut der Universität, Heidelberg

Zeitschrift f. Hygiene 148, 157—158 (1961)

Aus dem Istituto Zooprofilattico Sperimentale in Perugia
(Direktor: Prof. Dr. T. Rosati)

Weitere Versuche über die Anwendung der INH-Chemoprophylaxe bei der Rindertuberkulose

Von
L. Badiali

(Eingegangen am 18. September 1961)

Im Istituto Zooprofilattico in Perugia wird seit 1953 über die Anwendung der Chemoprophylaxe mit Isoniazid bei der Bekämpfung der Rindertuberkulose gearbeitet. Bisher wurden drei Versuchsreihen durchgeführt, über die bereits berichtet wurde. In den am 5. Dezember 1959 beendeten Versuchen der dritten Untersuchungsreihe wurde nachgewiesen, daß mit Tuberkulose infizierte und mit Isoniazid nach der Methode von O. Zorini (Behandlungscyclen wechseln mit Ruheperioden ab) behandelte Rinder nicht nur einer Kontaktinfektion widerstehen, sondern auch eine Resistenz erlangen, die sie befähigt, ohne Schädigung eine massive künstliche Infektion zu überstehen.

Während die mit Isonicotinsäure behandelten Tiere der dritten Versuchsreihe eine Woche nach Beendigung der Behandlung einer künstlichen Reinfektion ausgesetzt waren, sollte bei den in der vierten Versuchsreihe durchgeführten Untersuchungen geprüft werden, ob die antituberkulöse Resistenz auch noch längere Zeit nach der Behandlung mit Isonicotinsäure anhält. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen soll hier kurz berichtet werden.

Zehn 4 Monate alte tuberkulosefreie Kälber, die von tuberkulosefreien Müttern und aus gesunden und kontrollierten Beständen stammten, wurden am 1. März 1960 in der Weise einer Tuberkulose-Infektion ausgesetzt, daß sie 3 Monate lang in Kontakt mit Tuberkuloseausscheidern gehalten wurden. Nach 26 bzw. 40 Tagen reagierten alle Kälber bei der Tuberkulinprobe positiv. Von den zehn Tieren wurden sechs mit Isonicotinsäure behandelt, während vier — damit kein Zweifel über die erfolgte Tuberkuloseinfektion bestehen konnte — als unbehandelte Kontrollen belassen wurden. Die Isonicotinsäure (10 mg/Tag/kg Körpergewicht) wurde in drei Cyclen täglich verabreicht:

Im ersten Cyclus erfolgte die Verabreichung des Mittels 2 Monate lang, worauf eine zweimonatige Ruhepause einsetzte. Der zweite Behandlungscyclus dauerte ebenfalls 2 Monate, die Ruhepause nur 1 Monat. Im dritten Behandlungscyclus wurde das Mittel 1 Monat lang den Tieren verabfolgt. Die Tuberkuloseausscheider wurden nach 3 Monaten aus dem Stall entfernt. Gleichzeitig wurden die behandelten Tiere von der Kontrollgruppe abgesondert. Die Kontrolltiere wiesen im Laufe der Zeit klinische Symptome der Tuberkulose und bei der Schlachtung tuberkulöse Veränderungen auf.

6 Monate nach Beendigung der Isonicotinsäure-Verabreichung wurden die Versuchstiere durch subcutane Injektion von 50 mg (Feuchtgewicht)

einer virulenten Kultur von Mycobact. tuberculosis, Typus bovinus, reinfiziert.

Gleichzeitig wurden weitere vier Tiere von gleichem Gewicht, Alter und Rasse wie die behandelten Kälber, die vor 6 Monaten mit BCG vacciniert waren, künstlich infiziert. Diese mittels einer schon bekannten Methode immunisierten Tiere wurden als Maßstab für die erhöhte antituberkulöse Resistenz der mit Isonicotinsäure behandelten Versuchsgruppe herangezogen.

Außer den sechs mit Isonicotinsäure behandelten und den vier BCG-Tieren wurden weitere vier Kälber von gleichem Gewicht, Rasse und Alter künstlich mit Tuberkulose infiziert, um die Wirksamkeit und Stärke der experimentellen Infektion aufzuzeigen. Nach der künstlichen Infektion wurden alle Tiere 2 Monate lang auf das Vorliegen klinischer Symptome geprüft und anschließend geschlachtet.

Die klinischen Befunde (Temperatur, Gewichtszunahme, Infektionsgranulom) zeigten deutliche Unterschiede zwischen den unbehandelten Kontrollen und den beiden anderen Gruppen. Ein besonders klares Bild ergab sich nach dem Schlachten bei der am 8. Juli 1961 durchgeführten anatomisch-pathologischen Untersuchung. Im Rahmen dieser vorläufigen Mitteilung möchte ich nur darauf hinweisen, daß bei den mit Isonicotinsäure behandelten und den mit BCG vaccinierten Tieren nur Infektionsgranulome und Befall der Regional-Lymphknoten, dagegen bei den Kontrollen generalisierte tuberkulöse Veränderungen festgestellt wurden. Nach Beendigung der zur Zeit noch laufenden kulturellen, biologischen und histologischen Untersuchungen werden die Versuchsergebnisse mit den genauen Protokollen veröffentlicht werden.

Die klaren Ergebnisse der klinischen und anatomisch-pathologischen Untersuchungen des vorliegenden Versuches lassen erkennen, daß noch 6 Monate nach Beendigung der Behandlung mit Isonicotinsäure eine erhöhte antituberkulöse Resistenz gegenüber der subcutanen Infektion mit 50 mg einer Mycobact. tuberculosis-Kultur voll wirksam war. Durch diese Befunde wird der Wert der INH-Prophylaxe noch stärker als durch die bisherigen Untersuchungen unterstrichen, und es ergeben sich neue und erweiterte Perspektiven ihrer praktischen Anwendung.

Literatur

Badiali, L.: L'idrazide dell'acido isonicotinico nella tubercolosi bovina, esperimento di profilassi. Vet. ital. **5**, 7 (1954).

Rosati, T., e L. Badiali: La chemioprofilassi della tubercolosi bovina mediante isoniazide. Riv. Tuberc. **7**, 207 (1959).

Rosati, T., e L. Badiali: Ricerche sulla chemioprofilassi attiva antitubercolare e prove comparative con la vaccinazione con BCG. Notiz. Ist. vaccin. antituberc. **10**, 7 (1960).

Professor Dr. L. Badiali,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria, Perugia/Italia, Via S. Constanzo 14

Zeitschrift f. Hygiene 148, 159—167 (1961)

Aus der Kinderklinik (Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Mai) und dem
Hygiene-Institut (Direktor: Prof. Dr. H. Reploh)
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Tierexperimentelle Studien zum Problem der natürlichen Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen

IV. Mitteilung:

Der Einfluß von Staphylokokkentoxinen auf die mit Fremdeiweiß vorbehandelte weiße Ratte *

Von
M. Kienitz, W. Ritzerfeld, W. Hüther und J. Rath

(Eingegangen am 9. September 1961)

In Fortführung unserer Untersuchungen zur Pathogenese der Staphylokokkensepsis eiweißvorbehandelter Ratten entstand die Frage, welche Rolle in diesem Zusammenhang den Staphylokokkentoxinen beigemessen werden muß. Orientierende Versuche mit zwei Rohfiltraten der Stämme Wood 46 und V 24 hatten gezeigt, daß weder eiweißvorbehandelte noch gesunde Tiere auf die intravenöse Einbringung von 1 ml dieser Toxine in merkbarer Weise reagierten[8]. Die seinerzeit erhobenen Befunde genügten für eine beweiskräftige Aussage jedoch nicht, sondern verlangten eine Wiederholung mit gereinigten Toxinpräparaten an einem größeren Tiermaterial.

Als Arbeitshypothese wurde zunächst angenommen, daß mit der Herabsetzung der natürlichen Resistenz durch die Injektion von heterologem Protein auch die Toleranz gegenüber Staphylokokkentoxinen vermindert wird. Eine experimentelle Bestätigung dieser Annahme könnte den Entstehungsmechanismus der Sepsis eiweißvorbehandelter Ratten in wesentlichen Punkten erklären. Denn zweifellos dürfen vor allem die Stoffwechselprodukte der Staphylokokken für die bedrohlichen Krankheitserscheinungen der Sepsis verantwortlich gemacht werden, wenngleich in der Toxinschädigung des Organismus nicht das einzige pathogenetische Moment zu sehen ist.

Material und Methodik

Für die Versuche wurden insgesamt 151 weibliche weiße Ratten mit einem Gewicht von 120—180 g verwendet. Einzelheiten über Tierhaltung, Eiweißsensibilisierung, Herstellung der Keimaufschwemmungen, Technik der Injektion und

* Mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

der routinemäßig durchgeführten sonstigen Untersuchungen (Urinuntersuchung, Blutkultur, Organkultur, Histologie) sind unserer ersten Mitteilung[7] zu entnehmen.

Die zu prüfenden, gereinigten Toxine* lagen als lyophilisiertes Produkt, das Staphylokokkentoxin (Behringwerke*) in flüssiger Form vor. Die spezifische Wirksamkeitsprüfung der verschiedenen Toxintrockenpräparate, die vor dem Gebrauch in physiologischer NaCl-Lösung verdünnt wurden, unterblieb. Diese Untersuchungen erfolgten bereits in den Ursprungsinstituten, zum Teil durch einen von uns (K.), und bedurften im Hinblick auf die seitdem verstrichene kurze Zeitspanne keiner Wiederholung.

Nachstehend sind die benutzten Toxine mit den jeweiligen Dosierungsangaben (stets bezogen auf das Einzeltier) aufgeführt:

1. α-Toxin L 16 (Ottawa) 3,5 mg/ml
   Injektionsdosis: 0,5 ml (= 1,75 mg) und 0,25 ml (= 0,87 mg).
2. β-Toxin L 16 (Ottawa) Lösung I: 12,5 mg/ml
   Injektionsdosis: 0,5 ml (= 6,25 mg)
   Lösung II: 6,25 mg/ml.
   Injektionsdosis: 0,5 ml (= 3,1 mg)
3. Enterotoxin ML 5 (Ottawa) 2,8 mg/ml
   Injektionsdosis: 0,5 ml (= 1,4 mg)
4. Enterotoxin S-6, KF 56 (Chicago) 1,0 mg/ml
   Injektionsdosis: 0,5 ml (= 0,5 mg)
5. Staphylokokkentoxin (Behringwerke) (LH 0,09 ml)
   Injektionsdosis: 0,1, 0,2, 0,4 ml.

Für die Toxin-Antitoxinversuche verwendeten wir das Staphylokokkenserum der Behringwerke und das Staphylokokken-α-Antitoxin des Statens Seruminstitut Kopenhagen. Die zur Neutralisierung des Toxins notwendigen Serummengen wurden durch Titration gegen Kaninchenerythrocyten nach der von uns früher beschriebenen Methodik[5] ermittelt und dann verdoppelt dem Toxin 60 min vor Versuchsbeginn zugesetzt. Aufbewahrung des Ansatzes im Wasserbad bei 37° C unter mehrfachem Schütteln.

Die bei einem Teil der Ratten abschließend vorgenommene Infektion erfolgte mit den virulenten Staphylokokkenstämmen V 24, 161 und 8638 (an 3 Tagen 0,5 ml einer Keimaufschwemmung von $6 \cdot 10^6$ Staphylokokken). Tötung der Tiere (soweit nicht spontan eingegangen) nach der letzten Infektion.

Ergebnisse

Die intravenöse Injektion der beiden Enterotoxinpräparate S-6 KF 56 und ML 5, des α-Toxins L 16 und des β-Toxins L 16 an 40 eiweißvorbehandelte und 40 gesunde Ratten blieb innerhalb einer Beobachtungszeit von mindestens 2 Wochen ohne erkennbare klinische Folgen. Gewichtsverluste waren nicht zu verzeichnen, vielfach kam es sogar zur Gewichtszunahme. Vereinzelt aufgetretene Entzündungen im Schwanzbereich heilten unbehandelt ab.

2 Wochen nach der Toxininjektion wurden 32 Tiere getötet. An den Organen ließen sich makroskopisch keine krankhaften Veränderungen

* Wir danken an dieser Stelle Prof. Dr. Dr. G. M. Dack und Prof. Dr. Bergdoll (Food Research Institut, Univ. of Chicago), Dr. F. S. Thatcher und Dr. J. Robinson (Dept. of Public Health, Food and Drug Administration, Ottawa) sowie den Behringwerken für die großzügige Überlassung der einzelnen Staphylokokkentoxine.

erkennen. Die histologische Untersuchung ergab bei den eiweißvorbehandelten Tieren im wesentlichen die schon in unserer ersten Mitteilung[7] beschriebenen nephrotischen Nierenveränderungen. Unerwartet boten jedoch auch die Nieren- und Leberschnitte derjenigen Ratten, die ohne vorangehende Sensibilisierung mit heterologem Protein der einmaligen Dosis eines der oben genannten Staphylokokkentoxine ausgesetzt wurden, gewisse pathologische Zeichen.

Tier Nr. 392 (keine Eiweißvorbehandlung, einmalige Injektion von 0,5 ml Enterotoxin S-6 KF 56).

Niere: In der Übersicht normale Blutfülle, keine ins Auge fallenden Abweichungen von der Norm. Bei stärkerer Vergrößerung sind die Glomeruli intakt, die Tubuli contorti im ganzen normal strukturiert, an einzelnen Stellen jedoch Sekret enthaltend und trüb geschwollen. Gerade Harnkanälchen o. B. Im anhängenden gefäßreichen Bindegewebe auffallend viele eosinophile Zellen erkennbar.

Leber: Struktur im ganzen regelrecht. Normale Blutfülle. An mehreren Stellen kleine Zellansammlungen (eosinophile Zellen, Lymphocyten) mit Bevorzugung der Nähe von Gefäßen und der Glissonschen Dreiecke.

Anders war das Verhalten der 71 Tiere, die das Staphylokokkentoxin Behringwerke injiziert erhielten. Die Dosis von 0,1 ml Toxin/Ratte wurde bis auf gelegentliche leichtere Reaktionen gut vertragen, während 0,2 ml Toxin/Ratte ausnahmslos schwere Krankheitserscheinungen und 0,4 ml Toxin/Ratte fast immer den Tod herbeiführten. Wenige Minuten nach der Injektion von 0,4 ml Staphylokokkentoxin Behringwerke wurden die Tiere apathisch, hockten regungslos in der Käfigecke und wiesen mehrfach schon Paresen der Hinterbeine auf. Die Vergiftungszeichen nahmen zu und führten nach Krämpfen, Schnappatmung oder manchmal auch ohne diese agonalen Symptome zum Tod in extremer Streckstellung der Extremitäten. Die Absterberaten sind aus Tab. 1 zu ersehen. Das einzige Tier, das die Dosis von 0,4 ml Toxin überlebte, hockte während der folgenden 4 Wochen unbeweglich auf seinem Platz und reagierte nur träge auf Berührungen.

Vergleicht man nun das Verhalten der eiweißvorbehandelten und der gesunden Ratten gegenüber dem Staphylokokkentoxin Behringwerke, so ergibt sich die erstaunliche Tatsache, daß eiweißvorbehandelte Tiere die Dosis von 0,2 ml Toxin/Ratte besser tolerieren als die Kontrolltiere (Tabelle). Verdoppelung der Toxindosis auf 0,4 ml verwischt dieses Bild merklich, da nun die LD_{100} erreicht ist und mit einer Ausnahme alle Tiere der Einwirkung des Toxins erliegen. Im unteren Teil der Tabelle sind die Ergebnisse der Toxin-Antitoxin-Versuche aufgeführt, aus denen hervorgeht, daß nur mit dem Staphylokokkenserum Behringwerke ein neutralisierender Effekt gegenüber dem injizierten Toxin zu erreichen ist, während das reine α-Antitoxin wirkungslos bleibt.

Die Sektion derjenigen Tiere, die innerhalb der ersten Stunden nach Injektion des Staphylokokkentoxins der Behringwerke verendet waren,

zeigte ein stark blutgefülltes Herz mit maximal erweiterten Vorhöfen. Leber und Milz erwiesen sich als sehr blutreich und erheblich vergrößert. Dem makroskopischen Befund entsprach das histologische Bild:

Tabelle. *Untersuchungen zur Wirkung des Staphylokokkentoxins (Behringwerke) auf eiweißvorbehandelte Ratten (E) und gesunde Kontrolltiere (K)*

Toxinbezeichnung	Dosis (ml)	Anzahl der Tiere	† nach 12	24	48	72	96 Std	überlebend
Staph.-Toxin Behring	0,2	10 (E)	—	1	1	1	1	6
Staph.-Toxin Behring	0,2	10 (K)	—	2	2	2	1	3
Staph.-Toxin Behring	0,4	10 (E)	—	6	2	—	2	—
Staph.-Toxin Behring	0,4	9 (K)	—	5	2	1	—	1
Staph.-Toxin Behring + Staph.-Serum Behring	0,4	6 (K)	—	—	—	—	—	6
Staph.-Toxin Behring + α-Antitoxin	0,4	6 (K)	—	6	—	—	—	—

Tier Nr. 484 (keine Eiweißvorbehandlung, einmalige Injektion von 0,4 ml Staphylokokkentoxin Behringwerke, Tod nach etwa 6 Std).

Niere: In der Übersicht extreme Blutfülle besonders am Übergang von der Rinde zum Mark. Ödemflüssigkeit im Nierenkelchsystem. Bei stärkerer Vergrößerung findet sich ein vorwiegend interstitiell gelagertes Ödem mit Capillarhyperämie im Bereich der Glomeruli sowie um die abführenden Harnkanälchen herum. Tubuli contorti trüb geschwollen mit Exsudat in den Lumina. Tubuli recti intakt.

Leber: Blutfülle der Capillaren. Trübe Schwellung der Leberzellen bei sonst normaler Zellstruktur.

Herzmuskel: deutliche Capillarhyperämie.

Milz: enorme Blutfülle, sonst keine auffälligen Befunde.

Die hier erkennbare Nierenschädigung ist offensichtlich anhaltend und bleibt auch nach 2 Wochen noch gut erkennbar.

Tier Nr. 321 (keine Eiweißvorbehandlung, einmalige Injektion von 0,2 ml Staphylokokkentoxin Behringwerke, getötet 2 Wochen nach der Injektion).

Niere: Bei der Übersicht findet man an mehreren Stellen vorzugsweise im Gebiet größerer Arterien dichte Zellanhäufungen. Es handelt sich dabei um Lymphocyten und eosinophile Zellen. Nierenrinde und -Mark ohne grobe Strukturveränderungen, normale Blutfülle. Im anhängenden gefäßreichen Bindegewebe ebenfalls auffallend viele eosinophile Zellen. Tubuli contorti stellenweise trüb geschwollen, gelegentlich mit Eiweißzylindern. Glomeruli zum Teil unauffällig, zum Teil aber auch sehr zellreich, hyperämisch und geschwollen, oft von der Umgebung kaum abgrenzbar. Gerade Harnkanälchen überwiegend im Sinne einer Nephrose verändert, interstitielles Ödem.

Zum Abschluß der Toxinversuche erfolgte 4 Wochen später die Infektion der überlebenden Tiere mit 0,5 ml Keimaufschwemmungen (Keimzahl $6 \cdot 10^6$) der Stämme V 24, 161 und 8638. Wir verwendeten hierzu 60 Ratten in fünf Gruppen zu jeweils zwölf Tieren, entsprechend den fünf geprüften Staphylokokkentoxinen. Tötung 10 Tage nach der ersten Infektion.

Schon makroskopisch und deutlicher noch bei mikroskopischer Untersuchung zeigten fast alle Tiere die charakteristischen Organveränderungen der Sepsis. Dieses Ergebnis überraschte insofern, als auch 27 der 30 nur mit einem der Staphylokokkentoxine vorbehandelten Ratten erkrankten. Vor allem waren wieder die Nieren betroffen.

Tier Nr. 355 (keine Eiweißvorbehandlung, einmalige Injektion von 0,5 ml α-Toxin L 16, infiziert mit Stamm 161).

Niere: In der Übersicht mehrere kleine Abscesse am Übergang von der Rinde zum Mark mit Leukocytencylindern in den zum Teil erweiterten geraden Harnkanälchen. Mäßige Capillarhyperämie. Zellige Infiltration im Interstitium um die Abscesse herum. Glomeruli unauffällig. Tubuli contorti zum Teil Sekret enthaltend.

Die Intensität der septischen Veränderungen stand in keiner Abhängigkeit von Art und Dosis des vorher injizierten Toxins, so daß an Hand des vorliegenden Materials Aussagen über diesbezügliche Wirkungsunterschiede der verwendeten Staphylokokkentoxine nicht möglich sind.

An 60 Ratten ermittelten wir unter absolut gleichartigen Bedingungen das Verhalten des Staphylokokken-α-Antitoxintiters, der bei den 30 eiweißvorbehandelten Tieren mit einem Mittelwert von 0,34 AE/ml wesentlich unter dem der nicht vorbehandelten Tiere (Mittelwert 0,76 AE/ml) lag. Die einmalige Toxininjektion genügte in der Regel nicht für die Produktion nachweisbarer Antitoxinmengen. Hierzu war die bei den vorgenannten 60 Ratten durchgeführte Infektion notwendig. Die Unterschiede in den beiden Gruppen werden durch die Mittelwerte nur ungenügend gekennzeichnet. So ließen sich in Gruppe I (eiweißvorbehandelte Tiere) Antitoxintiter über 1,0 AE/ml nicht, in Gruppe II (nicht vorbehandelte Tiere) jedoch sechsmal feststellen (2,0—4,0 AE/ml).

Diskussion der Ergebnisse

Die am Anfang dieser Arbeit gestellte Frage nach der Beeinflussung der Toxinempfindlichkeit weißer Ratten durch die Vorbehandlung mit Fremdeiweiß läßt sich an Hand der dargelegten Versuchsergebnisse eindeutig beantworten. Nur das Staphylokokkentoxin der Behringwerke erbrachte einen am lebenden Tier erkennbaren Effekt und führte bei einer Dosis von 0,4 ml Toxin/Ratte unterschiedslos zu schwersten Vergiftungserscheinungen mit letalem Ausgang. Dagegen wurden 0,2 ml Toxin/Ratte von den eiweißvorbehandelten Tieren wesentlich besser toleriert als von den gesunden (d. h. nicht mit Fremdeiweiß sensibilisierten) Kontrolltieren. Über die Ursachen dieses Phänomens lassen sich nur Vermutungen anstellen. Möglich wäre, daß im Rahmen der durch die Nephrose bedingten Eiweißstoffwechselstörung (und der vermehrten Eiweißausscheidung) auch das Toxin rascher abgebaut wird. Somit darf man folgern, daß die Vorbehandlung der weißen Ratte mit Fremdeiweiß die Empfänglichkeit dieser Tiere gegen Staphylokokkentoxine nicht erhöht, sondern eher vermindert.

Die pathologisch-anatomischen Befunde an den durch das Staphylokokkentoxin der Behringwerke getöteten Ratten entsprechen denen, wie sie Kraus u. Pribram[11], von Lingelsheim[12], Nélis u. Bouckaert[14] vor allem am Kaninchen erhoben haben. Aus neuerer Zeit sind die Mitteilungen von Wiegershausen[17,18], der mit Mäusen, Ratten und Meerschweinchen arbeitete, zu erwähnen. Wiegershausen unterscheidet offenbar letales Toxin und α-Toxin nicht voneinander. Wir konnten mit gereinigtem α-Toxin keine merkbare Reaktion unserer Versuchstiere erzielen. Die in der Tabelle aufgeführten Toxin-Antitoxinversuche zeigen, daß die für Ratten tödliche Komponente nicht im α-Toxin zu suchen ist. Der protektive Effekt des Staphylokokkenserums spricht unseres Erachtens für eine Ausschaltung des letalen Toxins, dessen oft bestrittene Eigenständigkeit hiernach ihren Beweis gefunden hätte. Wir sahen uns leider nicht in der Lage, das letale Toxin in Reinsubstanz an der Ratte zu prüfen und können daher diesem Fragenkomplex zunächst nicht nachgehen. Das Staphylokokkentoxin der Behringwerke hemmt im Warburg-Versuch das Wachstum verschiedener Staphylokokkenstämme, während die übrigen Toxine diesen Effekt nicht erkennen lassen (Kienitz u. Ritzerfeld[6]). Keinesfalls darf man aus diesen Beobachtungen auf eine Unwirksamkeit partiell gereinigter Toxinpräparate schließen. Guerin u. Mitarb.[2] haben berichtet, daß Staphylokokkentoxine, die zum Teil identisch mit den von uns verwendeten Präparaten waren (zumindest aber nach dem gleichen Prinzip gereinigt wurden), in Fibroblastenkulturen aus Hühnerembryonenherzen charakteristische Veränderungen hervorriefen. Diese Ergebnisse erklären vielleicht den Nierenbefund ausschließlich mit Staphylokokkentoxin vorbehandelter Ratten. Die durch Fremdeiweiß bzw. Staphylokokkentoxin bedingten pathologisch-anatomischen Nierenveränderungen unterschieden sich nur graduell, nicht aber grundsätzlich. Also ist die Toxinämie, so gering auch ihre klinischen Erscheinungen sein mögen, für die Ratte nicht bedeutungslos, sondern bereitet den Boden für die nachfolgende Infektion. Ähnliche Auffassungen, bezogen auf Streptokokkeninfektionen der Niere, vertreten Sarre u. Rother[16]. Nimmt man an, daß gleichartige Vorgänge auch im menschlichen Organismus möglich sind, so erhält die anerkannte Rolle der „banalen" Hautinfektionen als Voraussetzung für das Entstehen einer Sepsis des Kindes (siehe auch Marget[13]) noch mehr an Gewicht. Wir müßten dann, im Gegensatz zu Höring[3], feststellen, daß Bakterientoxine bei der Pathogenese einer Sepsis von erheblicher Bedeutung sind. Besonders in den ersten Lebenswochen können so die Voraussetzungen für das Angehen der Allgemeininfektion geschaffen werden, da hier der Faktorenkomplex der unspezifischen Resistenz offensichtlich wenig gefestigt und daher leicht beeinflußbar erscheint.

In diesem Zusammenhang ist schließlich noch auf die Herabsetzung der Antikörperbildung eiweißvorbehandelter Ratten einzugehen. Sie ist für das Schicksal des Tieres ohne Belang, läßt aber gewisse Rückschlüsse auf eine Beeinträchtigung des RES durch die Sensibilisierung mit heterologem Protein zu. Die Blockierung des RES, dem ja auch die Aufgabe der Keimvernichtung obliegt, würde demnach das Angehen der Staphylokokkeninfektion bei der sonst hochgradig resistenten Ratte erklären. Dem gesunden Tier gelingt es offensichtlich, eine experimentell gesetzte Bakteriämie ohne nachhaltige Folgen für den Organismus zu überwinden. Mit anderen Worten: Die keimvernichtende Funktion des RES normergischer gesunder Ratten verhindert die Entwicklung einer Sepsis und bestimmt damit entscheidend die Empfänglichkeitslage des Organismus. Der Eintritt des Fremdproteins in den Organismus bedingt bekanntlich die Bildung von Antikörpern, deren Reaktion mit dem vorwiegend in der Niere fixierten Antigen die zweite Phase eines immunbiologisch bedeutsamen Vorganges darstellt (Kay[4]). Hieraus resultiert nach Kiraly[10] eine hyperergische Empfänglichkeitslage. Unverständlich bleibt in unserer Versuchsanordnung die auch von Kiraly[9,10] festgestellte Aussparung der Glomeruli von diesem Prozeß. Andere Autoren (Lit. siehe Sarre u. Rother[16]) betonen immer wieder die zentrale Stellung des Glomerulusapparates, der bevorzugt von der Eiweißablagerung betroffen wird. Diese Differenzen ändern nichts an der grundsätzlichen Bedeutung der Niere als desjenigen Organs, in dem der Sepsisherd lokalisiert ist. Verantwortlich hierfür sind neben der immunbiologisch bedingten Minderung der Organempfänglichkeit (lokale Resistenz) sicher die besonderen Durchblutungsverhältnisse der Nieren. Auch die Staphylokokkensepsis des Menschen geht nach Bingold[1] häufig mit der Ausbildung von Nierenherden einher.

Ungeachtet aller Einwände gegen die Übertragung der im Tierexperiment gewonnenen Ergebnisse auf die Klinik lassen sich einige Parallelen nicht verkennen. Wir werden auf diese Fragen an anderer Stelle eingehen und beabsichtigen, die Reihe der in dieser Zeitschrift veröffentlichten Mitteilungen durch einen weiteren Bericht über verschiedenartige Untersuchungen an der eiweißvorbehandelten Ratte abzuschließen.

Zusammenfassung

An 151 weißen Ratten wurde die Wirkung verschiedener Staphylokokkentoxine mit und ohne vorangehende Fremdeiweißsensibilisierung überprüft. Dabei kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

1. Die intravenöse Injektion von partiell gereinigtem α-Toxin, β-Toxin und Enterotoxin blieb bei eiweißvorbehandelten (Gruppe I) und gesunden Tieren (Gruppe II) ohne klinisch erkennbare Folgen. Pathologisch-

anatomisch fanden sich jedoch auch bei den Kontrolltieren (Gruppe II) Nierenveränderungen, wie sie in stärkerer Ausprägung nach Fremdeiweißsensibilisierung aufgefunden werden. Im nachfolgenden Infektionsversuch erkrankten die Ratten der Gruppe II mit wenigen Ausnahmen an einer Sepsis, so daß eine Minderung der natürlichen Resistenz durch die Toxineinwirkung angenommen werden darf.

2. Das Staphylokokkentoxin Behringwerke führte bei einer Dosierung von 0,4 ml/Ratte unterschiedlos bei eiweißvorbehandelten und nicht vorbehandelten Ratten zu schweren Krankheitserscheinungen mit letalem Ausgang. Die Dosis von 0,2 ml Toxin/Ratte wurde von den eiweißvorbehandelten Tieren wesentlich besser toleriert als von den gesunden Kontrolltieren. Danach hat die durch intravenöse Injektion von heterologem Protein bewirkte Durchbrechung der natürlichen Resistenz keinen Einfluß auf die Toxinempfindlichkeit der weißen Ratte.

3. Die Fähigkeit zur Antikörperbildung, beurteilt nach dem Verhalten des Staphylokokken-α-Antitoxintiters, wird durch die Fremdeiweißvorbehandlung merklich herabgesetzt. Dieser Befund deutet auf die Blockierung des RES und seiner keimvernichtenden Funktion hin.

Literatur

[1] Bingold, K.: Die septischen Erkrankungen. Handb. Inn. Med. 4. Aufl. Bd. I, 1, S. 943ff. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1952.

[2] Guerin, M. M., A. W. Jackson and J. F. Morgan: Susceptibility of tissue cultures to purified staphylococcal toxins. 11th Ann. Meeting Canad. Soc. Microbiol. Kingston 11.—14. 6. 1961.

[3] Höring, F.: Sepsis. Klinik der Gegenwart, Bd. 1. München: Urban & Schwarzenberg 1955.

[4] Kay, C. F.: Mechanism by which experimental nephritis is produced in rabbits injected with duck serum. J. exp. Med. **72**, 559 (1940).

[5] Kienitz, M., u. J. Kümmel: Der Staphylokokken-α-Antitoxintiter bei Neugeborenen und ihren Müttern. Z. Immun.-Forsch. **120**, 53 (1960).

[6] Kienitz, M., u. W. Ritzerfeld: Über die Beeinflussung des Bakterienwachstums durch Staphylokokken-Toxine. Klin. Wschr. **39**, 760 (1961).

[7] Kienitz, M., W. Ritzerfeld u. R. Sebers: Tierexperimentelle Untersuchungen zum Problem der natürlichen Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen. I. Die Erzeugung einer Staphylokokkensepsis bei der weißen Ratte nach Verabreichung von Fremdeiweiß. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 15 (1960).

[8] Kienitz, M., W. Ritzerfeld u. R. Sebers: Tierexperimentelle Untersuchungen zum Problem der natürlichen Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen. II. Die Behandlung der Staphylokokkensepsis eiweißvorbehandelter Ratten mit antitoxischen Staphylokokkenserum und Serum gesunder Ratten. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 28 (1960).

[9] Kiraly, L.: Infektionsmöglichkeit allergisierter Ratten durch Herabsetzung natürlicher Resistenz. Kongr. Ges. ungar. Kinderärzte. Budapest 1959.

[10] Kiraly, L.: Die Rolle der Allergie in der Ursache der Sepsis (unveröffentlicht).

[11] Kraus, R., u. E. Pribram: Über Staphylokokkentoxin und dessen Antitoxin. Wien. klin. Wschr. **19**, 493 (1906).

[12] Lingelsheim, W. von: Ätiologie und Therapie der Staphylokokkeninfektionen. Berlin u. Wien: Urban & Schwarzenberg 1900.
[13] Marget, W.: Die Krankenhaus-Staphylokokken. Beih. Arch. Kinderheilk. **43**. Stuttgart: Enke 1961.
[14] Nélis, P., et J. J. Bouckaert: Action cardiaque de la toxine staphylococcique chez le lapin et chez le chien. C. R. Soc. Biol. (Paris) **113**, 1157 (1933).
[15] Ritzerfeld, W., M. Kienitz u. R. Neuhaus: Tierexperimentelle Untersuchungen zum Problem der natürlichen Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen. III. Behandlung von Staphylokokken-Infektionen eiweißvorbehandelter Ratten mit Tetracyclinen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 488 (1961).
[16] Sarre, H. u. K. Rother: Gegen Niere gerichtete Antikörper. In: Miescher, P., u. K. O. Vorlaender: Immunpathologie in Klinik und Forschung. Stuttgart: Thieme 1957.
[17] Wiegershausen, B.: Über einige pharmakologische Eigenschaften von Staphylolysin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **238**, 144 (1960).
[18] Wiegershausen, B.: Zur Pharmakologie von Staphylokokkentoxin (Wood 46) I. Die letale Wirksamkeit von Staphylokokkentoxin. Acta biol. med. germ. **6**, 86 (1961).

Dr. M. Kienitz,
Universitäts-Kinderklinik, Münster/Westf., Robert Koch-Straße 31
Dr. W. Ritzerfeld,
Hygiene-Institut der Universität, Münster/Westf., Westring 10

Zeitschrift f. Hygiene 148, 168–192 (1961)

Aus den Laboratorien der Stiftung zur Erforschung der spinalen Kinderlähmung und der Multiplen Sklerose, Hamburg-Eppendorf

Die Neuropathogenität abgeschwächter Polioviren im Affenexperiment

Von

H. Pette, H. Lennartz, G. Maass, L. Valenciano und K. Mannweiler

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. September 1961)

Auf der von der Pan American Health Organization und der World Health Organization 1959 in Washington veranstalteten Konferenz über die Polio-Lebendvaccine[7] kamen erhebliche Differenzen in der Wertung der verschiedenen Vaccinestämme (Cox, Koprowski, Sabin) zum Ausdruck. Es differierten nicht nur die Ansichten über die Auswahl der Virusstämme für die Herstellung von Lebendimpfstoffen, es gab auch Differenzen über Fragen der zu fordernden Sicherheit und der Wertbemessung von Impfstoffen. Zwar waren schon 1958 seitens des Surgeon General in Washington Empfehlungen für die Herstellung und Prüfung der Impfstoffe aufgestellt worden, um der Industrie Richtlinien für die Produktion zu geben, man hatte diese aber 1959 und 1960 einer erheblichen Revision unterziehen müssen. Anlaß hierfür waren die Ergebnisse von Feldversuchen, die in verschiedenen Ländern durchgeführt waren[4].

Immerhin glaubte das den Surgeon General beratende Komitee es auf Grund der bisher durchgeführten Impfungen im August 1960 verantworten zu können, die orale Polio-Schutzimpfung zu empfehlen. Das mit größter Vorsicht abgefaßte Skriptum geht hierbei von bestimmten Voraussetzungen aus, deren wichtigste der Grad der Neuropathogenität der für die Impfstoffe verwendeten Polio-Virusstämme für Rhesus- oder Cynomolgusaffen ist. Hatte man 1959 noch die Ergebnisse einer intracerebralen (i. c.) und intraspinalen (i. sp.) Inoculation bei Affen zur Grundlage einer Unschädlichkeitsprüfung der Impfstoffe gemacht, kam man durch die Untersuchungen von Melnick u. Mitarb.[9] und Kirschstein u. Mitarb.[6] zu der Erkenntnis, daß darüber hinaus die Prüfung der Invasionsfähigkeit der Stämme, d. h. ihre Fähigkeit, sich extraneural zu vermehren und in das ZNS einzudringen, durch die intramuskuläre (i. m.) Verabreichung ein unbedingtes Erfordernis sei.

Wenn man auch jüngst den Typ I von Sabin als Referenzstamm bei der Prüfung der Neuropathogenität gewählt hat, so ist damit noch kein definitives Urteil über die Stämme von Cox und Koprowski gesprochen (siehe hierzu unter anderem die Stellungnahme von Koprowski).

Die Kritik an der Wertigkeit der Lebendvaccine war im vollen Gange, als wir 1959 mit unseren experimentellen Untersuchungen zur Prüfung der Neuropathogenität dieser Stämme begannen. Wenn man auch vielfach der Ansicht zuneigte, daß der Polio-Lebendimpfstoff gegenüber der Vaccine aus inaktivierten Viren (Salk) den Vorzug verdiene, so blieben doch grundsätzliche Fragen unbeantwortet. Dies kam bereits auf der ersten internationalen Konferenz über den Polio-Lebendimpfstoff in Washington 1959 zum Ausdruck. Vor allem zur Frage der Unschädlichkeit dieses Impfstoffes einen Beitrag zu liefern, war in erster Linie der Zweck unserer, an einem großen Affenmaterial durchgeführten Untersuchungen.

Über einen Teil unserer Befunde haben wir auf der 2. internationalen Konferenz im Juli 1960 in Washington[8] berichtet. Da diese Befunde nur in den Berichten dieser Tagung erschienen sind, halten wir es für angezeigt, unsere Ergebnisse, die in der Zwischenzeit erweitert wurden, auch im deutschen Schrifttum niederzulegen, um so mehr, als voraussichtlich noch viel experimentiert werden muß, bis in diesen Fragen volle Klarheit herrscht. Vielleicht können unsere Befunde Ausgang und Grundlage für weitere Diskussionen bilden.

Für die im folgenden zu schildernden Untersuchungen standen uns die abgeschwächten Polio-Virusstämme von Cox und Sabin zur Verfügung; lediglich äußere Gründe hinderten uns, die Stämme von Koprowski in die Untersuchung einzubeziehen.

Material und Untersuchungsmethoden

Die von uns verwendeten Rhesusaffen mit einem Gewicht von 1500—3000 g wurden jeweils in Gruppen von vier bzw. fünf Tieren zusammengefaßt und an ihnen der Impfstoff in verschiedener Dosierung geprüft. Die Affen erhielten zu Beginn der Versuche etwa 10 Tage lang täglich Aureomycin (bei der Prüfung des Typ I-Stammes von Cox Terramycin), um etwaige Durchfallerkrankungen möglichst zu verhindern.

Inoculationstechnik. Es wurde die von Murray[10] angegebene Technik verwendet, d.h. 0,2 ml intraspinal (i.sp.) zwischen dem ersten und zweiten Lendenwirbelkörper in die Lumbalanschwellung des Rückenmarks und 2 × 0,5 ml intracerebral (i.c.) bzw. intrathalamisch beiderseits inoculiert. Die Injektionen erfolgten in Äthernarkose. Die benutzten Stämme, einschließlich der hier ermittelten Viruskonzentration, sind in der folgenden Tabelle angegeben. Die Verdünnung der zu untersuchenden Virusstämme erfolgte in TCM 199.

Bezeichnung und Titer der benutzten Virusstämme

	Typ	Stamm	PFU/1,0	$TCID_{50}$/1,0
Sabin	I	L Sc, 2 a b	$10^{6,7}$	$10^{8,5}$
	II	P 712, Ch, 2 a b	$10^{7,0}$	$10^{7,0}$
	III	Leon 12 a_1 b	$10^{6,7}$	$10^{6,3}$
Cox	I	7 — 1231 — 166	$10^{6,5}$	$10^{6,2}$
	II	7 — 1232 — 243	$10^{6,2}$	$10^{6,0}$
	III	7 — 1233 — 344	$10^{7,0}$	$10^{7,3}$

Virusisolierung. Den Tieren wurde vor Beginn der Versuche und einmal wöchentlich während des Versuches Stuhl entnommen, der in üblicher Weise aufgearbeitet und in Affennierenkulturen verimpft wurde. Bei der Sektion wurde aus dem Lumbal- und Cervicalmark, aus dem Hirnstamm und der Zentralregion Material zur virologischen Untersuchung entnommen und nach Verreibung zu 10%igen Suspensionen in Affennierengewebekulturen auf das Vorhandensein von Polioviren untersucht.

Virustitration. Anfertigung zehnfacher Verdünnungsreihen, Inoculationsdosis pro Röhrchen 0,1 ml, pro Verdünnungsstufe wurden im allgemeinen fünf Röhrchen verwendet. Die Berechnung der Virustiter erfolgte nach Reed u. Muench[11]. Die Feststellung der Plaque-bildenden Einheiten erfolgte in Flaschen nach der Technik von Hsiung u. Melnick[5].

Antikörperbestimmung. Den Tieren wurde vor Beginn und einmal wöchentlich während des Versuches Blut zur serologischen Untersuchung entnommen. Die Feststellung der neutralisierenden Antikörper erfolgte im Colortest nach der Methode von Salk u. Mitarb.[12].

Beobachtung der Tiere. Die Tiere wurden täglich untersucht, wobei vor allem auf die Feststellung von Extremitätenlähmungen Wert gelegt wurde; außerdem wurde auf das Verhalten der Muskelreflexe, vor allem des Patellarreflexes geachtet. Die Affen wurden 21 Tage beobachtet, danach wurden sie in Äthernarkose getötet.

Histologische Technik. Gehirn und Rückenmark wurden zur histologischen Untersuchung entnommen und in 10%iger Formalinlösung fixiert. Paraffineinbettung; Färbungen nach Nissl, mit Häm. Eosin, nach v. Gieson und Heidenhain. Lumbal- und Cervicalanschwellung wurde in jeweils sechs Blöcken eingebettet, von jedem Block wurde eine Schnittfläche untersucht. Aus dem Thorakalmark wurden gleicherweise drei Ebenen untersucht, aus dem Hirnstamm der obere und der untere Teil, aus dem Gyrus praecentralis beiderseits (apikaler Anteil) jeweils ein Stück. Die Einteilung der Läsionen von 1—4+ und Angaben über Ausmaße der Läsionen im Rückenmark wurden nach der Methode von Melnick[7] vorgenommen.

Ergebnis

A. Klinische Feststellungen

Nach i.c. Inoculation traten in drei Fällen traumatisch bedingte Störungen auf. Während der Beobachtungszeit ließen sich bei keinem i.c. geimpften Tier Extremitätenparesen feststellen.

Nach i.sp. Inoculation zeigten alle Tiere, bei denen die Injektion regelrecht in das Lumbalmark erfolgt war, unmittelbar danach auftretende Lähmungen, die sich in den folgenden 2 Tagen bisweilen noch verstärkten. Diese traumatisch bedingten Lähmungen bestanden meist in Paresen von Zehen- und Fußbeugern, selten in Lähmungen der Unterschenkelmuskulatur. Im Hinblick auf die so entstandenen Lähmungen ließen sich die Paresen, die auf eine Poliovirusauswirkung zurückzuführen waren, hiervon nur schwer abgrenzen. Deshalb wurden die innerhalb 48 Std nach der Injektion auftretenden Paresen als unmittelbar traumatisch bedingt gewertet, als poliovirusbedingt nur die hiernach erstmalig bemerkten Lähmungen. Die als Ausdruck einer virusbedingten Nervenzelläsion zu wertenden Lähmungen äußerten sich ebenfalls als Paresen der Unterschenkel- und Fuß-, selten auch der Oberschenkelmuskulatur; das Ausmaß der Lähmungen zeigte alle Übergänge von leichter Parese bis zur Paralyse. Zu Paresen der oberen Extremitäten, vorwiegend leichter Art, kam es nur in vier Fällen nach i.sp. Inoculation des Typ II-Stammes von Cox. Im allgemeinen kamen die Lähnungen etwa 10 Tage nach der Injektion zum Stillstand. Das Sistieren des

Prozesses fand seinen Ausdruck auch in einer gelegentlichen Rückbildung der Paresen und einer Wiederkehr des Patellarreflexes. Der Allgemeinzustand der Tiere blieb durchweg gut. Bei einem Affen (Nr. 99), geimpft mit Typ II Cox, wurde eine Paralyse vom Landry-Typ als Folge der i.sp. Injektion des Virus beobachtet, die dazu führte, daß das Tier am 6. Tag nach der Impfung moribund getötet werden mußte.

B. Histopathologische Befunde

Die Tiere mit pathologischen Veränderungen im ZNS, die 21 Tage nach der Impfung getötet worden waren, zeigten Entzündungsvorgänge in der grauen Substanz mit Ganglienzellausfall und degenerativen Erscheinungen verschiedener Art (Chromatolyse, Vakuolisierung des Cytoplasma, Schrumpfung und Pyknose der Kerne und anderes). Der Ganglienzellausfall ist an einigen Stellen sehr deutlich, Neuronophagien sind nicht mehr erkennbar, wohl aber entzündliche Reaktionen der mesodermalen Elemente; im Vordergrund steht jeweils die diffuse und knötchenförmige Wucherung der Mikrogliazellen, die zusammen mit einigen Lymphocyten und Plasmazellen die sogenannten Gewebsinfiltrate bilden; perivasculäre Infiltrate fehlen niemals. Leukocyten werden sowohl im Gewebe als auch in den perivasculären Infiltraten völlig vermißt.

Das Fehlen von Neuronophagien erklärt sich ohne weiteres aus der Prozeßdauer, da sich bei den interkurrent gestorbenen Tieren sowohl akut geschädigte Nervenzellen als auch mikrogliöse und leukocytäre Neuronophagien nachweisen lassen.

Topik des Prozesses. *Rückenmark.* Sehen wir von den traumatischen Läsionen ab, so finden wir bei Affen, die über die unmittelbar traumatisch bedingten Schäden hinaus Läsionen zeigten, nach i.sp. Inoculation die bekannten entzündlichen Veränderungen im Rückenmarksgrau und zwar betont im Vorderhorn, im Lumbalmark ausgesprochener als im Cervicalmark. Bei den i.c. geimpften Tieren ist das Ausmaß der entzündlichen Alterationen im Cervical- und Lumbalmark meist ungefähr gleich. In den Fällen, bei denen das Lumbal- und Cervicalmark zugleich befallen ist, erweist sich stets auch das Thorakalmark, wenngleich weniger ausgesprochen, mitergriffen. Demgegenüber wird die weiße Substanz, abgesehen von den traumatischen Alterationen an der Injektionsstelle, stets frei von Veränderungen gefunden.

Hirnstamm. Der Prozeß ist hier fleckförmig über die Kerngebiete verteilt ohne sonderliche Prädilektion, auch bleibt die weiße Substanz verschont. Bei den Tieren, die i.c. geimpft wurden und entzündliche Alterationen im Rückenmark zeigten, bis auf Affe Nr. 147, hat der Prozeß auch den Hirnstamm befallen, allerdings in geringer Intensität.

Großhirn. Hier zeigt nur die motorische Rinde eindeutige, aber nicht sehr ausgeprägte entzündliche Alterationen.

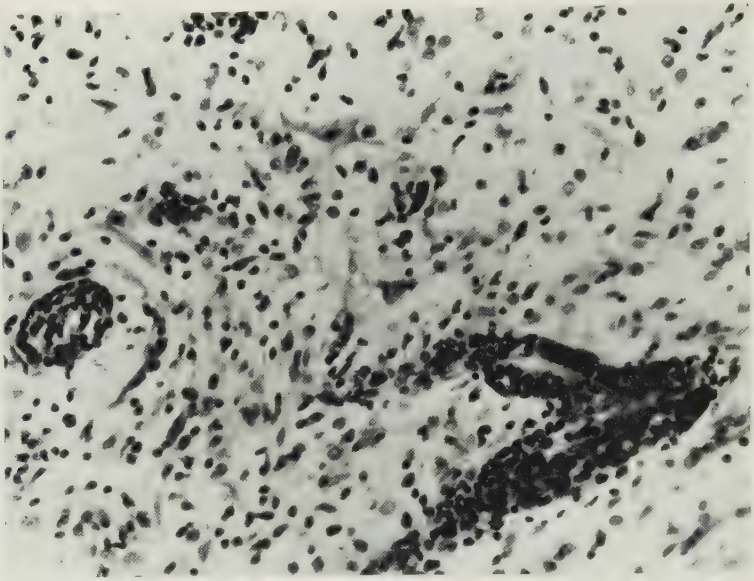


Abb. 1. Sabin Typ III. Intraspinale Inoculation. Im Lumbalmark entzündliche Reaktion. (Nissl-Bild)

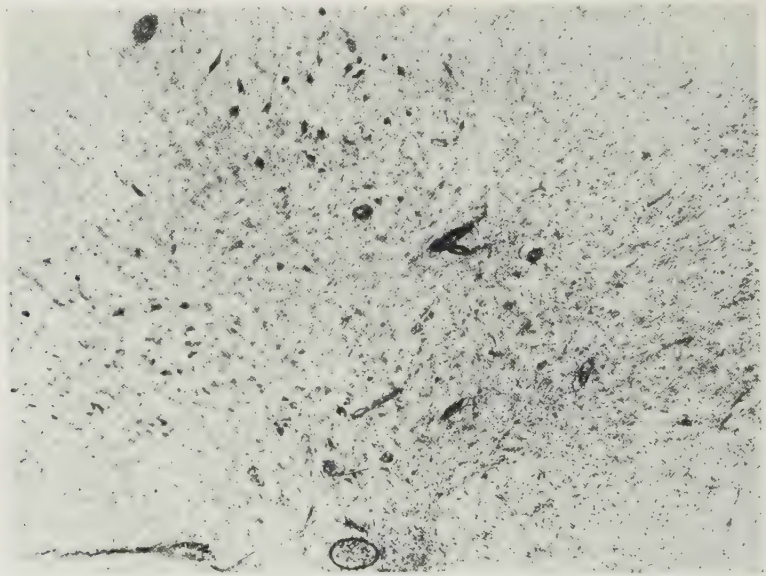


Abb. 2. Sabin Typ III. Intraspinale Inoculation. Im Cervicalmark entzündliche Infiltrate. (Nissl-Bild)

Zusammenfassend ist zu den pathomorphologischen Veränderungen zu sagen, daß die Qualität der feingeweblichen Alterationen (Schädigung und Ausfall der Nervenzellen, Reaktion der Mikroglia, Ansammlung

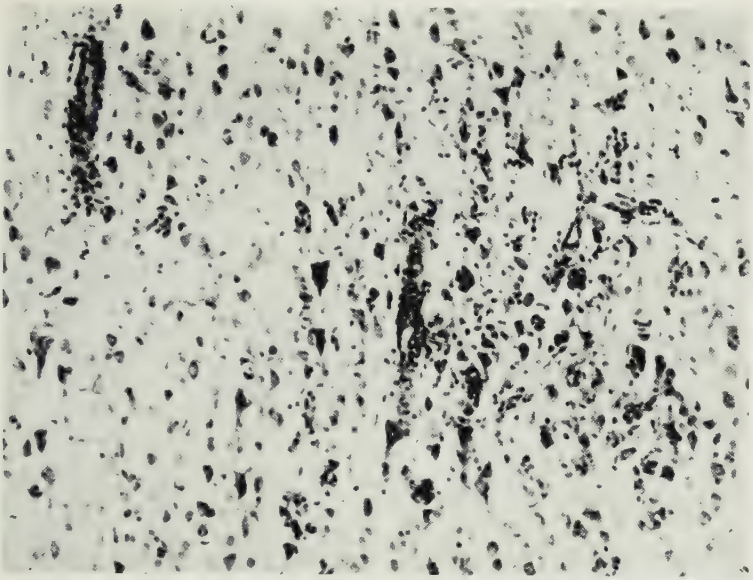


Abb. 3. Sabin Typ III. Intraspinale Inoculation. In der Präzentralregion entzündliche Läsionen. (Nissl-Bild)

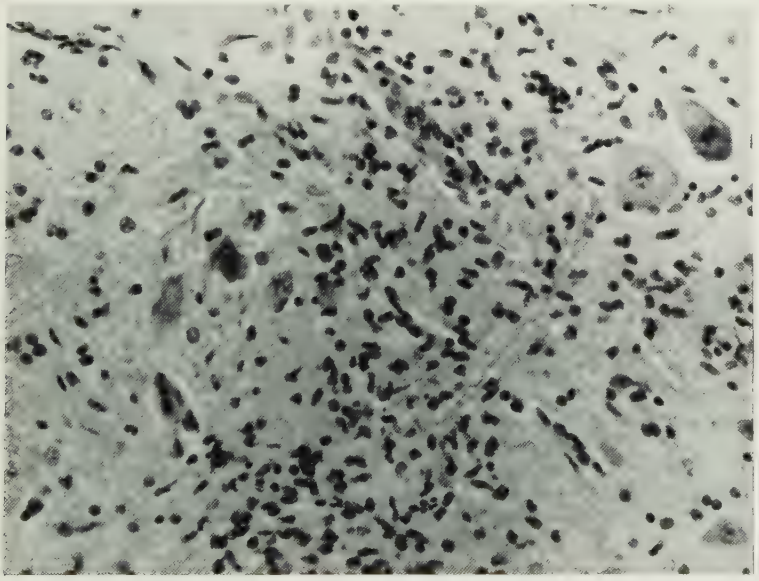


Abb. 4. Cox Typ II. Intraspinale Inoculation. Im Lumbalmark geschädigte Ganglienzellen und entzündliche Reaktion. (Nissl-Bild)

von Lymphocyten und Plasmazellen) und die Verteilung der spezifischen Läsionen (graue Substanz des Rückenmarks und des Hirnstammes

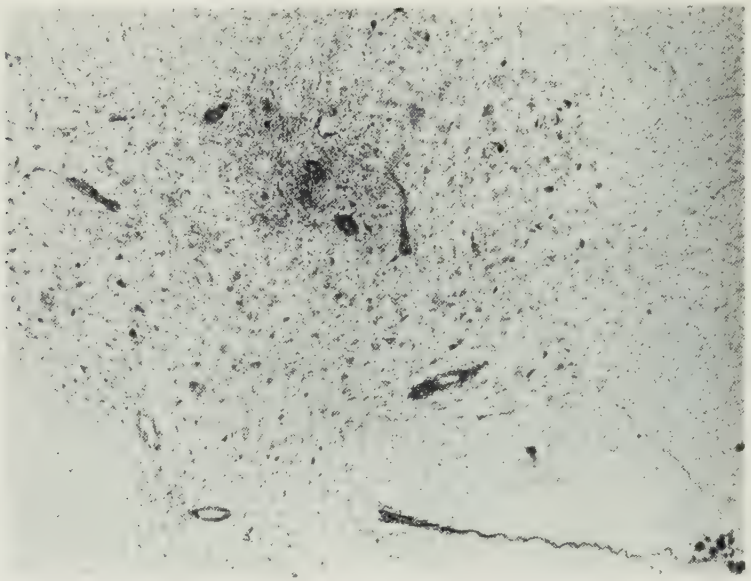


Abb. 5. Cox Typ II. Intraspinale Inoculation. Im Cervicalmark perivasculäre und Gewebsinfiltrate. (Nissl-Bild)

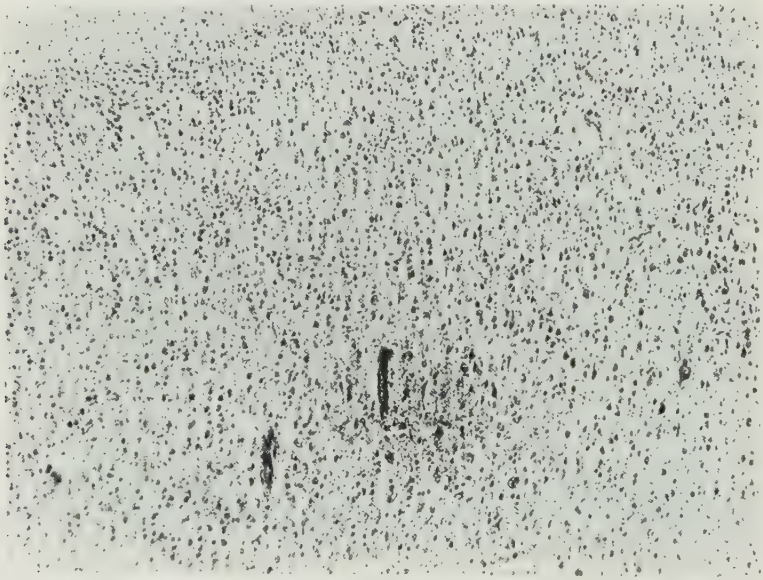


Abb. 6. Cox Typ II. Intraspinale Inoculation. In der Präzentralregion entzündliche Läsion. (Nissl-Bild)

sowie motorische Rinde) dem Prozeß entsprechen, wie wir ihn bei einer nicht schweren experimentellen Poliomyelitis beobachten (Abb. 1—6).

Histologisch sind eindeutige Unterschiede zwischen den einzelnen Affen erkennbar, und zwar sowohl in Abhängigkeit vom jeweiligen Virusstamm als auch von der Art der Inoculation. Diese Unterschiede sollen im folgenden dargestellt werden.

Typ I. Intraspinale Impfung (Tab. 1). Alle Tiere zeigen im Lumbalmark traumatische Alterationen als Folge der Impfung in Form von Nekrosen mit Fettkörnchenzellbildung und reparativen Reaktionen mesenchymaler und makrogliöser Zellelemente. Diese traumatisch bedingten Läsionen sind identisch mit Befunden bei den mit Tusche (siehe unten) zur Kontrolle geimpften Tieren.

Tabelle 1. *Ergebnisse der histologischen Untersuchung nach i.c. und i.sp. Inoculation*
Typ I

Verd.	Cox (6,5 PFU/1,0)				Sabin (6,7 PFU/1,0)			
	L.	C.	H.St.	Z.R.	L.	C.	H.St.	Z.R.
	i.sp. Inoculation							
10^0	3/3	3	3	0	5/5	0	0	0
10^{-1}	4/4	3	2	1	4/4	0	0	0
10^{-2}	5/5	5	1	1	3/3	2	1	0
	i.c. Inoculation							
10^0	0/5	0	0	0	0/4	0	0	0
10^{-1}	0/5	0	0	0	0/5	0	0	0
10^{-2}	0/5	0	0	0	0/5	0	0	0

Anzahl von Affen mit Polio-Läsionen/Anzahl geimpfter Affen.
L. = Lumbalmark, C. = Cervicalmark, H.St. = Hirnstamm. Z.R. — Zentralregion. Die im Nenner genannte Anzahl geimpfter Affen ist für jede Verdünnungsstufe nur einmal genannt.

Darüber hinaus finden wir bei den Versuchstieren entzündliche Alterationen etwas entfernt von der Impfstelle, die als Folge einer Virusvermehrung angesprochen werden müssen. Bei einem mit dem Sabin-Stamm inoculierten Affen dehnt sich der Prozeß bis zum Hirnstamm, bei einem anderen bis zum Cervicalmark aus. Bei den mit dem Cox-Stamm injizierten Affen erreicht der Prozeß dreimal die präzentrale Windung, viermal den Hirnstamm und viermal das Cervicalmark. Bei den mit dem Sabin-Stamm geimpften Affen sind die Alterationen durchweg weniger intensiv als bei den mit dem Cox-Stamm geimpften Affen.

Intracerebrale Impfung. Hier finden sich bei den Affen beider Gruppen außer im Bereich der Injektionsstelle keine Veränderungen, die über die unmittelbare Injektionsfolge hinausgehen.

Typ II. Intraspinale Impfung (Tab. 2). Alle Tiere zeigen im Lumbalmark die oben beschriebenen traumatischen und entzündlichen Veränderungen. Bei den mit dem Sabin-Stamm geimpften Tieren dehnt

sich der Prozeß zweimal bis zum Hirnstamm aus. Ausgedehnter sind die Veränderungen bei den mit dem Cox-Stamm inoculierten Tieren; in elf Fällen reicht der Prozeß bis zur Präzentralwindung, in drei Fällen bis zum Hirnstamm. Auch hier sind die Alterationen intensiver als bei den mit dem Sabin-Stamm infizierten Tieren, wie dies auch klinisch in dem Auftreten von leichten Lähmungen zum Ausdruck gekommen ist.

Tabelle 2. *Ergebnisse der histologischen Untersuchung nach i.c. und i.sp. Inoculation*
Typ II

Verd.	Cox (6,2 PFU/1,0)				Sabin (7,0 PFU/1,0)			
	L.	C.	H. St.	Z. R.	L.	C.	H. St.	Z. R.
	i.sp. Inoculation							
10^0	4/4	4	4	4	4/4	1	1	0
10^{-1}	5/5	5	5	3	4/4	0	0	0
10^{-2}	5/5	5	4	4	4/4	1	1	0
	i.c. Inoculation							
10^0	3/5	3	4	3	0/3	0	0	0
10^{-1}	4/5	4	4	1	0/5	0	0	0
10^{-2}	3/5	3	3	3	0/5	0	0	0

Anzahl von Affen mit Polio-Läsionen/Anzahl geimpfter Affen.

Tabelle 3. *Ergebnisse der histologischen Untersuchung nach i.c. und i.sp. Inoculation*
Typ III

Verd.	Cox (7,0 PFU/1,0)				Sabin (6,7 PFU/1,0)			
	L.	C.	H. St.	Z. R.	L.	C.	H. St.	Z. R.
	i.sp. Inoculation							
10^0	5/5	2	3	2	4/4	1	1	1
10^{-1}	4/4	2	2	1	4/4	1	1	1
10^{-2}	4/4	2	2	2	5/5	1	0	0
	i.c. Inoculation							
10^0	2/5	2	2	0	0/4	0	0	0
10^{-1}	1/5	1	0	0	0/5	0	0	0
10^{-2}	0/5	0	0	0	0/5	0	0	0

Anzahl von Affen mit Polio-Läsionen/Anzahl geimpfter Affen.

Dabei sei ausdrücklich vermerkt, daß das Ausmaß der Schäden nicht von der verabreichten Virusdosis abhängt.

Intracerebrale Impfung. Bei den mit dem Sabin-Stamm geimpften Tieren sind keine virusbedingten Veränderungen nachweisbar. Anders bei den mit dem Cox-Stamm geimpften Tieren; hier dehnt sich der Prozeß einmal bis zum Hirnstamm, zehnmal bis zum Lumbalmark aus; siebenmal finden sich entzündliche Alterationen in der Präzentralwindung.

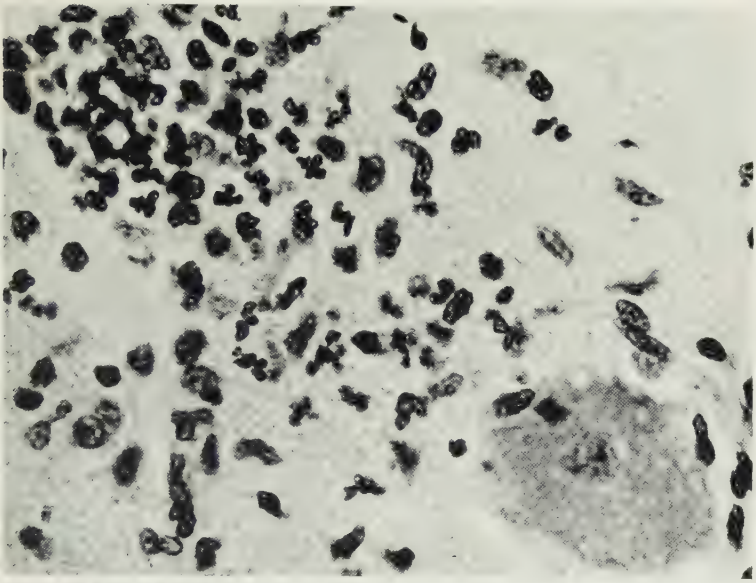


Abb. 7. Mahoney. Intraspinale Inoculation. Im Cervicalmark Neuronophagie. (Nissl-Bild)

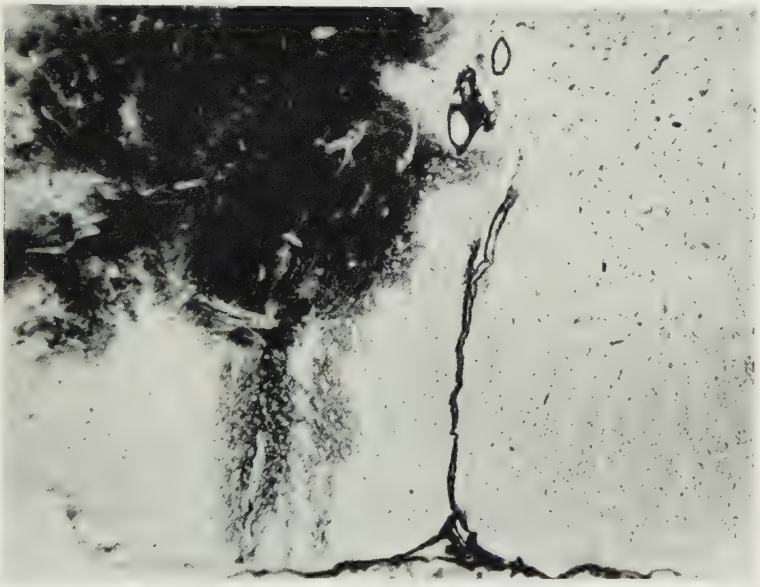


Abb. 8. Intraspinale Injektion von Tusche. Diese breitet sich im Subarachnoidalraum und perivasculär aus. (Nissl-Bild)

Typ III. Intraspinale Impfung (Tab. 3). Lumbal zeigen wieder alle Tiere die vorher beschriebenen traumatischen Läsionen. Bei den mit dem

Sabin-Stamm geimpften Tieren erreicht der Prozeß in zwei Fällen die präzentrale Region und in einem Fall das Cervicalmark. Bei den mit dem Cox-Stamm geimpften Tieren greift der Prozeß in fünf Fällen bis zur Präzentralwindung, in zwei Fällen bis zum Hirnstamm und in einem Fall bis zum Cervicalmark. Die Intensität der Läsionen ist hier etwa gleichwertig.

Intracerebrale Impfung. Hier zeigen die mit dem Sabin-Stamm geimpften Tiere keine virusbedingten Alterationen. Bei den mit dem

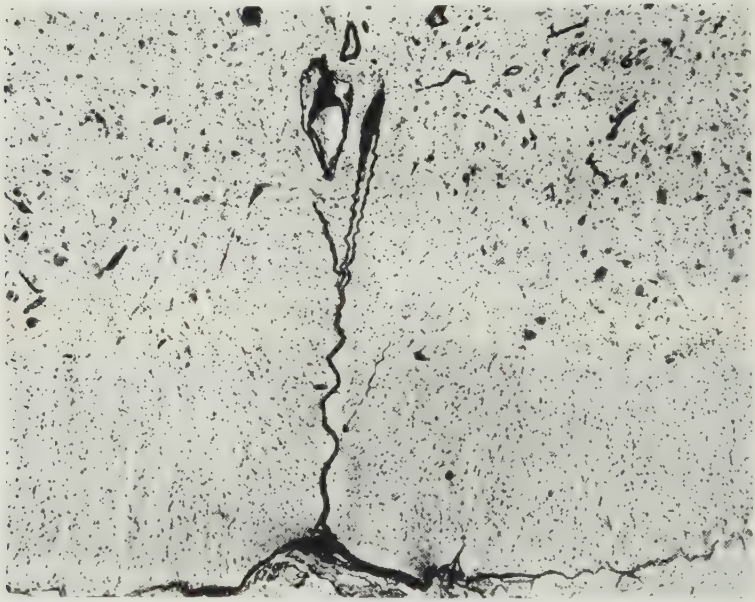


Abb. 9. Wie Abb. 8, etwas entfernt von der Injektionsstelle. (Nissl-Bild)

Cox-Stamm geimpften Tieren dehnt sich der Prozeß dreimal bis zum Lumbalmark aus.

Zur Kontrolle wurden Affen i.c. und i.sp. mit Polio Typ I, Stamm Mahoney, geimpft. Die Tiere erkrankten innerhalb weniger Tage mit schweren Lähmungen, sie wurden agonal getötet. Das histologische Bild zeigte die charakteristischen Zeichen einer schweren Poliomyelitis (Abb. 7).

Einem weiteren Affen wurde i.sp. Tusche zum Studium der Fremdkörperausbreitung von der Stichstelle injiziert. Es zeigte sich, daß die Tusche bei dem $^1/_2$ Std nach der Injektion getöteten Affen in die perivasculären und Liquorräume eingedrungen war (Abb. 8), sich aber nicht im Parenchym ausgebreitet hatte (Abb. 9).

C. Virusisolierung aus dem Zentralnervensystem

Bei den mit den Typen I und II von Sabin (Tab. 4) geimpften Affen gelang es nicht, nach Abschluß der Beobachtungszeit von 21 Tagen Virus aus dem ZNS (Lumbal-, Cervicalmark, Hirnstamm, Gyrus praecentralis) zu isolieren. Bei den mit Typ III von Sabin infizierten Tieren

Tabelle 4. *Virusisolierungen aus dem Zentralnervensystem*

Typ	Inocul.-Art	Verdünnung		
		10^0	10^{-1}	10^{-2}
Cox I	i.sp.	2/3	2/4	3/5
	i.c.	0/5	0/5	0/5
II	i.sp.	2/4	2/5	4/5
	i.c.	3/5	2/5	3/5
III	i.sp.	1/5*	0/4	0/3
	i.c.	0/5	1/5*	0/5
Sabin I	i.sp.	0/5	0/4	0/3
	i.c.	0/4	0/5	0/5
II	i.sp.	0/4	0/4	0/4
	i.c.	0/3	0/5	0/5
III	i.sp.	1/4	1/4	0/5
	i.c.	0/4	0/5	0/5

* Am 5. bzw. 7. Tag p.i. interkurrent gestorben.

Zahl der Tiere, bei denen aus mindestens einem untersuchten ZNS-Abschnitt Virus isoliert werden konnte/Zahl der inoculierten Tiere.

Tabelle 5. *Virusisolierung aus dem Zentralnervensystem (Sabin Typ III)*

Inocul.-Art Verdünnung	Affe Nr.	Versuchsdauer (Tage)	Lumbalmark	Cervicalmark	Hi.-Sta.	Zentr.-Reg.
i.sp. 10^0	190	21	$<2{,}0$*	$<2{,}0$	$<2{,}0$	negativ
i.sp. 10^{-1}	170	21	$<2{,}0$	$<2{,}0$	$<2{,}0$	negativ

* neg. log $TCID_{50}$/1 g. Hi.-St. = Hirnstamm, Zentr. Reg. = Zentralregion.

war dies nur bei zwei Affen möglich (Tab. 5), die beide i.sp. geimpft worden waren, dagegen nicht bei den i.c. geimpften Tieren.

Bei den mit den Stämmen von Cox infizierten Tieren war es nach Impfung mit dem Typ I möglich, bei sieben von zwölf intraspinal geimpften Tieren das Virus aus mindestens einem der untersuchten ZNS-Teile zu isolieren (Tab. 6), bei den intracerebral geimpften in keinem Fall (Tab. 4). Dagegen gelang es, bei den mit dem Typ II infizierten Affen sowohl bei den i.sp. wie auch bei den i.c. geimpften Affen in über der Hälfte der Tiere Virus im ZNS nachzuweisen (Tab. 7). Bei den mit dem Typ III von Cox geimpften Tieren gelang ein Virusnachweis nur

bei zwei Affen, die allerdings beide interkurrent vor Versuchsende gestorben waren (Tab. 8).

Tabelle 6. *Virusisolierungen aus dem Zentralnervensystem (Cox Typ I)*

Inocul.-Art Verdünnung	Affe Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Lumbal-mark	Cervical-mark	Hi.-Sta.	Zentr.-Reg.
i.sp.						
10^0	22	21	$<2{,}0$*	$<2{,}0$	negativ	$<2{,}0$
	23	21	negativ	negativ	negativ	$<2{,}0$
i.sp.						
10^{-1}	1	21	negativ	2,5	$<2{,}0$	3,3
	4	21	negativ	negativ	4,5	2,5
i.sp.						
10^{-2}	11	9	2,7	2,5	3,3	$<2{,}0$
	12	21	negativ	negativ	negativ	$<2{,}0$
	15	21	2,5	2,0	negativ	negativ

* neg. log $TCID_{50}$/1 g.

Tabelle 7. *Virusisolierungen aus dem Zentralnervensystem (Cox Typ II)*

Inocul.-Art Verdünnung	Affe Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Lumbal-mark	Cervical-mark	Hi.-Sta.	Zentr.-Reg.
i.sp.						
10^0	95	21	negativ	negativ	negativ	2,0*
	99	6	4,0	4,5	3,6	3,7
i.c.						
10^0	100	21	$<2{,}0$	negativ	2,3	$<2{,}0$
	102	21	negativ	2,0	$<2{,}0$	$<2{,}0$
	103	21	negativ	negativ	2,5	4,0
i.sp.						
10^{-1}	77	21	negativ	2,3	negativ	negativ
	79	21	$<2{,}0$	negativ	2,4	negativ
i.c.						
10^{-1}	83	21	negativ	$<2{,}0$	negativ	negativ
	84	21	negativ	$<2{,}0$	$<2{,}0$	negativ
i.sp.						
10^{-2}	85	21	$<2{,}0$	2,3	2,0	2,5
	87	21	negativ	$<2{,}0$	2,3	negativ
	88	21	$<2{,}0$	negativ	negativ	negativ
	89	21	negativ	$<2{,}0$	negativ	negativ
i.c.						
10^{-2}	91+	8	3,0	2,3	$<2{,}0$	negativ
	93	21	negativ	2,0	negativ	negativ
	94+	5	3,0	negativ	2,8	negativ
	199	21	negativ	2,0	negativ	negativ
	200	21	2,0	negativ	2,3	2,3
	201+	21	4,3	$<2{,}0$	3,5	3,7

* neg. log $TCID_{50}$/1 g.

+ Die Affen Nr. 91, 94 und 201 blieben bei der übrigen Darstellung unberücksichtigt.

Eine Abhängigkeit positiver Virusisolierungen aus dem ZNS von der Impfdosis ließ sich nicht feststellen. Die Virusisolierungen erfolgten in der überwiegenden Zahl nur aus einem oder auch aus zwei Teilen der untersuchten vier ZNS-Abschnitte, selten aus allen vier Anteilen

Tabelle 8. *Virusisolierungen aus dem Zentralnervensystem (Cox Typ III)*

Inocul.-Art Verdünnung	Affe Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Lumbal-mark	Cervical-mark	Hi.-Sta.	Zentr.-Reg.
i.sp.						
10^0	159	5	$<2{,}0$*	2,5	negativ	negativ
i.c.						
10^{-1}	147	7	2,2	2,3	$<2{,}0$	negativ

* neg. log $TCID_{50}$/1 g.

Tabelle 9. *Isolierungsbefunde aus dem Zentralnervensystem der in der 1. Woche p.i. gestorbenen Tiere*

Stamm Inocul.-Art Verdünnung	Affe Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Lumbal-mark	Cervical-mark	Hi.-Sta.	Zentr.-Reg.
Cox I						
i.sp.						
10^{-1}	5	5	negativ	negativ	negativ	negativ
i.c.						
10^{-2}	19	5	negativ	negativ	negativ	negativ
Cox II						
i.sp.						
10^0	99+	6	4,0*	$>4{,}5$	3,6	3,7
i.c.						
10^{-2}	91	8	3,0	2,3	2,0	negativ
	94	5	3,0	negativ	2,8	negativ
Cox III						
i.sp.						
10^0	159	5	$<2{,}0$	2,5	negativ	negativ
i.c.						
10^{-1}	147	7	2,2	2,3	$<2{,}0$	negativ
Sabin III						
i.sp.						
10^{-1}	171	6	negativ	negativ	negativ	negativ
i.c.						
10^{-2}	185	1	negativ	negativ	negativ	negativ

\+ Unter dem Bild einer Landryschen Paralyse gestorben.
* neg. log $TCID_{50}$/1 g.

(Tab. 5—8). Eine Beziehung der positiven Virusisolierung zum Inoculationsort, d. h. gehäufte Virusisolierungen aus dem Lumbalmark bei den lumbal geimpften bzw. aus der Hirnrinde bei den i.c. geimpften Tieren,

war nicht festzustellen. Versucht man eine Zuordnung der Isolierungsbefunde zur Schwere der vorher beschriebenen histologischen Alterationen der jeweils untersuchten Teile des Zentralnervensystems, so zeigt sich, daß durchweg bei schweren histologischen Alterationen auch der Nachweis einer Virusvermehrung geführt werden konnte. Aus dieser allgemein gültigen Feststellung läßt sich jedoch für den Einzelfall — aus nicht übersehbaren Gründen — keine Gesetzmäßigkeit ableiten. Diese Beziehung zwischen der Schwere der histologischen Veränderungen und der Isolierungsrate trifft zudem nur für die Tiere zu, die 21 Tage lang im Versuch waren. Bei den vorzeitig gestorbenen Affen konnte man dagegen gelegentlich Virus aus einzelnen Teilen des ZNS isolieren, ohne daß entsprechende histologische Alterationen in unmittelbarer Nachbarschaft nachweisbar waren (Tab. 9).

Im Hinblick auf die Beobachtungen von Bodian [1] über den Ablauf von Virusvermehrung und morphologischen Alterationen im ZNS bei der Poliovirus-Infektion kann man annehmen, daß es zu diesem frühen Zeitpunkt des Infektionsverlaufs, an dem eine Virusproduktion bereits nachweisbar war, wohl zu einer Schädigung von Neuronen, jedoch noch nicht zu einer Zerstörung von Nervenzellen und zu Gliareaktionen gekommen ist. Diese geschädigten Neurone sind bei der von uns angewandten Fixierung nicht mit hinreichender Sicherheit als Erreger-bedingt zu werten.

Bei vier Affen (Nr. 12, 22, 23, 103) ergab sich dieser Befund, d. h. Nachweis einer Virusvermehrung ohne charakteristische histologische Veränderungen, obwohl die Affen eine Versuchsdauer von 21 Tagen überlebt hatten. Da diese Diskordanz jedoch nur bei der Untersuchung des Gyrus praecentralis zu erheben war und für die virologische und histologische Untersuchung jeweils die Zentralwindung der anderen Seite verwendet worden war, muß einschränkend gesagt werden, daß diese Beobachtung möglicherweise methodisch bedingt ist.

Die in den virushaltigen Regionen des ZNS gefundenen Viruskonzentrationen ließen keine Parallelität zu dem Ausmaß der morphologisch faßbaren Schäden erkennen. Die Konzentrationen waren im allgemeinen geringer (Tab. 5—8) als die bei Kontrolluntersuchungen mit dem Stamm Mahoney gefundenen (Tab. 10). Die höchsten Viruskonzentrationen fanden wir bei dem Tier Nr. 99 (siehe oben), das unter dem Bild einer Landryschen Paralyse erkrankt und moribund getötet worden war.

Im Hinblick auf die allgemeine Parallelität zwischen der Häufigkeit der Virusisolierungen und der Schwere der morphologisch faßbaren Alterationen ist es verständlich, daß bei einem Vergleich der Häufigkeit positiver Virusisolierungen aus dem ZNS überhaupt mit dem Krankheitsbild der Tiere sich positive Isolierungen vor allem bei den Affen ergaben, bei denen die Lähmungen in der zweiten und dritten Beobachtungswoche noch fortgeschritten waren.

Die aus dem ZNS isolierten Stämme wurden an Hand der Marker d, T und MS auf mögliche Veränderungen der genetischen Struktur im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial untersucht (Einzelheiten dieser Untersuchung werden an anderer Stelle gesondert mitgeteilt). Bei allen Stämmen, von denen Virusisolierungen aus dem ZNS vorlagen (Sabin Typ III, Cox Typ I, II und III) fanden sich in einzelnen Fällen Veränderungen einzelner Marker, die jedoch in keinem Fall bis

Tabelle 10. *Virusisolierung aus dem Zentralnervensystem (Stamm Mahoney)*

Inocul.-Art Verdünnung	Affe Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Lumbal-mark	Cervical-mark	Hi.-Sta.	Zentr.-Reg.
i.sp.						
10^{-1}	124	2	5,7*	6,0	5,7	5,5
	168	3	5,3	5,0	3,3	4,7
i.c.						
10^{-1}	206	6	4,7	6,0	3,0	3,5
	207	4	5,7	4,5	3,7	5,2

* neg. log $TCID_{50}$/1 g.

Tabelle 11. *Antikörperbildung nach i.c. und i.sp. Inoculation*

Typ	Inocul.-Art	Verdünnung		
		10^{0}	10^{-1}	10^{-2}
I	i.sp.	2/3	0/4	0/5
	i.c.	3/5	1/5	0/5
Cox II	i.sp.	2/4	1/5	0/5
	i.c.	3/5	3/5	0/5
III	i.sp.	1/5	1/4	0/5
	i.c.	1/5	2/5	0/5
I	i.sp.	0/5	1/4	0/3
	i.c.	2/4	2/5	0/5
Sabin II	i.sp.	4/4	2/4	0/4
	i.c.	1/3	2/5	1/5
III	i.sp.	1/4	0/4	0/5
	i.c.	0/4	0/5	0/5

Anzahl von Affen mit Antikörpern/Anzahl der geimpften Affen.

zu dem Verhalten der jeweils als Kontrollen mitgeführten virulenten Stämme gingen. Auffallend war im Vergleich zu den übrigen Stämmen die relativ geringe Anzahl von Veränderungen der untersuchten genetischen Merkmale bei dem Typ II Stamm von Cox.

D. Antikörperbildung der Tiere

Bei allen Stämmen scheint eine Abhängigkeit der Produktion von neutralisierenden Antikörpern von der verabreichten Viruskonzentration zu bestehen (Tab. 11). Bei einer Verdünnung des Impfstoffes 1:100

kam es nicht mehr zur Antikörperbildung, mit einer Ausnahme, die den Typ Sabin II betraf; hier bildete noch einer von fünf Affen Antikörper. Es bestand kein Unterschied zwischen den Fällen nach i.c. und i.sp. Impfung. Eine Abhängigkeit der Antikörperbildung von dem Ausmaß und dem Vorkommen von Schäden im ZNS ließ sich nicht nachweisen, das heißt auch Tiere, bei denen die vermeintliche i.sp. Inoculation nicht in das Lumbalmark erfolgte, zeigen eine Antikörperbildung. Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen ergaben sich bei dem Typ II, wie oben bereits gezeigt, wo der Stamm von Sabin besonders häufig zu einer Antikörperbildung führte, und bei dem Typ III, bei dem der Stamm von Sabin nur in einem Fall die Antikörperproduktion anregte. Die Antikörpertiter waren teilweise hoch und überstiegen in Einzelfällen die Verdünnung 1:512. Ein Unterschied in der Titerhöhe zwischen den einzelnen Stämmen fand sich nicht.

E. Virusisolierung aus dem Stuhl

Es wurden insgesamt 627 vor und während des Versuches den Affen entnommene Stühle untersucht. Davon ließ sich in 206 Fällen ein cytopathogener Effekt in der Gewebekultur feststellen (43 Fälle zeigten den Typ des Adenovirus, in 159 Fällen war eine Typisierung nicht möglich, bei vier Fällen wurde Poliovirus isoliert).

F. Intramuskuläre Impfung

Es wurden die Typen I und III von Sabin und Cox auf den Grad ihrer Neuropathogenität nach i.m. Impfung geprüft.

Technik. Mit den Typen I und III von Cox wurden pro Stamm sechs Affen, mit den von Sabin fünf Affen i.m. geimpft. Die Injektion erfolgte am rechten Oberschenkel, die Inoculierungsmenge betrug 1 ml. Die Titer der benutzten Stämme sind in Tab. 12

Tabelle 12. *Ergebnisse nach intramuskulärer Inoculation*

Virusstämme Viruskonzentration	Impfdosis ml	Virämie	Paresen	Histologie	Antikörper-Bildung
Cox Typ I	1	0/6	1/6	1/6	5/6
$10^{4,5}$/0,25 ml	5	0/3	0/3	1/3	3/3
Typ III					
$10^{3,2}$/0,25 ml	1	0/6	0/6	0/6	2/6
Sabin Typ I					
$10^{4,5}$/0,25 ml	1	0/5	0/5	0/5	4/5
Typ III					
$10^{2,5}$/0,25 ml	1	0/5	0/5	0/5	0/5

angegeben. Die Affen wurden nach 21 Tagen in Äthernarkose getötet. Gehirn, Rückenmark und Ischiadikus beider Seiten sowie verschiedene innere Organe wurden in der oben angegebenen Weise histologisch untersucht.

Gleichzeitig wurden drei Affen mit je 5 ml des Typ I von Cox i.m. geimpft und nach 10, 12 bzw. 14 Tagen getötet.

Allen Affen wurde vor der Impfung und am Tage der Sektion sowie am 2., 3. und 4. Tage nach der Impfung Blut zum Nachweis einer Virämie sowie zur Untersuchung auf Antikörper entnommen.

Ergebnisse. *Virämie.* Bei keinem Affen ließ sich eine Virämie nachweisen (Tab. 12).

Antikörperbildung. Wie Tab. 12 zeigt, wurde eine Antikörperbildung bei Affen, die mit den Typ I-Stämmen (Cox und Sabin) geimpft waren, nachgewiesen, hingegen bei den mit Typ III geimpften nur bei zwei mit dem Cox-Stamm Geimpften, nicht aber bei den mit dem Sabin-Stamm Geimpften.

Klinische Beobachtung. Von den insgesamt 25 i. m. geimpften Affen hat nur einer (Affe 246), der mit 1 ml Typ I von Cox geimpft worden war, einen pathologischen Befund gezeigt. 14 Tage nach der Impfung kam es zu einer Parese des rechten Beines, die zunächst stationär blieb und sich am Ende der Beobachtungszeit etwas zurückbildete (Tab. 12).

Histologischer Befund. Von den 25 Affen zeigten nur zwei pathologische Veränderungen (Tab. 12). Einer von ihnen war der Affe 246; der andere (Affe 251) hatte 5 ml ebenfalls Typ I (Cox) erhalten. Er war 14 Tage nach der Impfung getötet worden, ohne klinisch nachweisbar erkrankt gewesen zu sein. Der histologische Befund war in beiden Fällen qualitativ prinzipiell der gleiche; nur quantitativ ist ein Unterschied erkennbar. Bei dem Affen 246 finden sich die stärksten Alterationen im Lumbalmark; hier zeigen sämtliche Segmente Zeichen einer schweren diffusen Entzündung mit einseitiger Betonung. Der Nervenzellausfall auf dieser Seite ist sehr ausgedehnt, dabei Spätstadien von Neuronophagien, diffuse und auch knötchenförmige Wucherungen der Mikroglia, perivasculäre Infiltrate bestehend aus Lymphocyten und Plasmazellen, während Leukocyten weder in den perivasculären noch in den Gewebsinfiltraten zu finden sind. Die Infiltrate greifen gelegentlich auch auf die weiße Substanz über. Daneben leichte lymphocytäre Meningitis sowie Infiltrate in den Nervenwurzeln dieser Region. Auf der kontralateralen Seite ist der Entzündungsprozeß nur leicht, der Nervenzellausfall gering. Ein Unterschied im histologischen Substrat gegenüber dem nicht gelähmten Affen besteht insofern als hier, d. h. bei dem Affen 251, der 14 Tage nach der Impfung getötet wurde, viele Nervenzellen der lumbalen Segmente das Bild einer diffusen Chromatolyse zeigen, ihr Cytoplasma ist chromatinarm, ein Bild, das sich nicht bei dem Affen 246 findet, der 21 Tage nach der Impfung getötet wurde; hier zeigen einige Nervenzellen eine zentrale Chromatolyse, während die peripheren Zonen gut gefärbte Nissl-Schollen erkennen lassen (Abb. 10).

Es ist ein Bild, das Bodian[1] als Ausdruck einer Regeneration von Nervenzellen wertet. Demgegenüber erlaubt die eben beschriebene diffuse Chromatolyse,

das Zeichen eines degenerativen Vorgangs, keine Aussage über das Schicksal dieser Zellen.

In den cervicalen Segmenten ist der Entzündungsprozeß in beiden Fällen nur sehr milde; die perivasculären und die Gewebsinfiltrate sind gering, die Nervenzellen zeigen lediglich vereinzelt degenerative Erscheinungen, ein Nervenzellausfall ist jedoch nicht mit Sicherheit zu erkennen. In den Kerngebieten des Hirnstammes finden sich nur einzelne mikrogliöse Knötchen. Im Großhirn zeigt nur der Affe 246 leichte

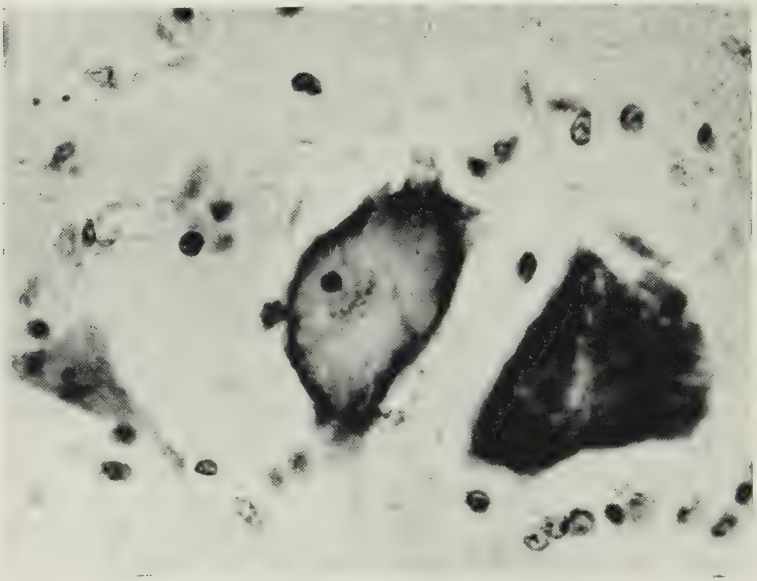


Abb. 10. Ganglienzelle mit zentraler Chromatolyse, Lumbalmark. Affe mit Typ I Cox i.m. geimpft und 21 Tage später getötet. (Nissl-Bild)

entzündliche Alterationen in Form von stellenweiser diffuser Mikrogliaproliferation und geringe perivasculäre Infiltrate, diese sind auf die präzentrale Windung beschränkt.

Diskussion

Das Ziel unserer Untersuchungen war, die abgeschwächten Polio-Virusstämme von Cox und Sabin, die für die Herstellung einer oralen Vaccine Verwendung gefunden haben, auf den Grad ihrer Neuropathogenität für den Rhesusaffen zu prüfen. Die Bestimmung der Neuropathogenität erfolgte in einer ersten Versuchsserie durch i. c. und i. sp. Verimpfung des Materials. Nachdem von Melnick[1] und Kirschstein[6] mitgeteilt worden war, daß diese Stämme auch in ihrer Fähigkeit zur extraneuralen Vermehrung und Fähigkeit zur Invasion des Zentral-

nervensystems (sogenannte Invasionskraft nach Bodian[2]) differieren können, haben wir auch diese Fähigkeit der Stämme in einer zweiten Versuchsserie untersucht.

Der Impfstoff wurde unverdünnt und in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 für die i.c. und i.sp. Inoculation verwendet. Die Affen erhielten intrathalamisch beidseitig je 0,5 ml und intraspinal 0,2 ml des jeweiligen Impfstoffes bzw. seiner Verdünnungen. Die Affen blieben durchweg 21 Tage im Versuch und wurden dann in Äthernarkose getötet. Einige mußten wegen intestinaler Störungen vor Abschluß der Beobachtungszeit aus dem Versuch genommen werden.

Nach der i.c. Impfung kam es in drei Fällen zu traumatischen Störungen, jedoch in keinem Fall – wie später histologisch festgestellt wurde — zu Lähmungen als Folge einer Virusvermehrung.

Als sicheres Zeichen, daß die i.sp. Impfung die graue Substanz der lumbalen Segmente erreicht hatte, galt der Reizeffekt in Form einseitiger Verkrampfungen der Zehen- und Fußmuskulatur. Wie zu erwarten, traten unmittelbar nach der Injektion fast regelmäßig einseitige Paresen der Zehen-, Fuß-, selten auch der Unterschenkelmuskulatur auf, die innerhalb der ersten 48 Std nach der Impfung noch an Intensität zunahmen, dann aber meist sistierten. Schritt die Lähmung weiter und griff auf andere Muskeln des Beines oder auf die andere untere Extremität über, so werteten wir dies als ein sicheres Zeichen für die virusbedingte Läsion von Ganglienzellen oberhalb der Injektionsstelle.

Eine exakte Trennung der unmittelbar traumatisch und andererseits der durch Virusvermehrung bedingten Lähmungen ist natürlich nicht möglich. Wir haben aus diesem Grunde, ähnlich wie Murray[10], die bis 48 Std nach der Impfung aufgetretenen Lähmungen als ausschließlich traumatisch bedingt angesehen.

Nur bei Affen, die mit dem Typ II-Stamm von Cox geimpft worden waren, wurden auch die oberen Extremitäten leicht paretisch. Bei einem dieser Affen (Nr. 99) kam es schon wenige Tage nach der Impfung zu einer aufsteigenden Lähmung vom Landry-Typ; er wurde 6 Tage nach der Inoculation getötet. In den übrigen Fällen kamen die Paresen nach etwa 1 Woche zum Stillstand. Vereinzelt wurde auch eine Rückbildung der Paresen beobachtet, was sich wiederholt in der Wiederkehr eines geschwundenen Patellarreflexes äußerte. Der Allgemeinzustand der Tiere blieb durchweg gut.

In der zweiten Versuchsreihe, bei der nur die Typen I und III des Coxschen und Sabinschen Impfstoffes verwendet wurden, erfolgte die Inoculation intramuskulär und zwar von je 1 ml in die Oberschenkelmuskulatur. Auch hier betrug die Beobachtungszeit 21 Tage. Von sechs mit Cox Typ I geimpften Affen erkrankte einer mit einer Beinparese, die einige Tage konstant blieb, sich gegen Ende der Beobachtungszeit aber wieder etwas zurückbildete. Schließlich wurden nochmals drei Affen mit

je 5 ml des Impfstoffes Cox Typ I i.m. geimpft. Bei diesen Affen, die am 10., 12. und 14. Tage getötet wurden, kam es nicht zu einer klinisch feststellbaren Lähmung.

Das klinische Bild der durch die abgeschwächten Polio-Virusstämme erzeugten Erkrankung unterscheidet sich von einer durch virulente Stämme erzeugten Poliomyelitis vor allem durch die fehlende Progression der neurologischen Störungen (mit Ausnahme von Affen Nr. 99).

Zur Kontrolle wurden je zwei Affen mit Polio Typ I, Stamm Mahoney, intracerebral und intraspinal infiziert. Bereits nach wenigen Tagen traten rasch fortschreitende Lähmungen aller vier Extremitäten auf. Die morphologischen Veränderungen im Zentralnervensystem dieser Tiere waren die einer schweren Poliomyelitis in voller Ausprägung (Abb. 7).

Auf Grund der klinischen Symptome ließ sich bereits feststellen, daß sich die mit abgeschwächten Viren erzeugte Polio grundsätzlich von einer mit virulenten Wildviren erzeugten Polio unterscheidet, da bei Auftreten von Paresen diese (bis auf Affe Nr. 99) nur leicht waren und im allgemeinen keine wesentliche Tendenz zur Progression zeigten.

Anders als bei den Kontrolltieren war der histologische Prozeß bei den Affen, denen abgeschwächte Viren inoculiert worden waren. Auch hier ließ sich in mehreren Fällen ein Ganglienzellausfall feststellen, jedoch niemals in stärkerem Ausmaß. Demgegenüber ist die entzündliche Reaktion in Form einer diffusen Wucherung mikrogliöser Elemente und perivasculärer Infiltrate (Lymphocyten, Plasmazellen, Histiocyten) im Vergleich zur Parenchymschädigung auffallend stark (Abb. 1—6). Da die Affen erst nach 21 Tagen getötet wurden, ist es nur bedingt möglich, eine Aussage darüber zu machen, ob und wie weit zu Beginn der Prozeßentstehung Ganglienzellen geschädigt waren, jedenfalls gilt dies für die i. c. und i. sp. geimpften Affen. Es ist anzunehmen, daß die Verhältnisse analog den Beobachtungen bei den i. m. geimpften Affen sind. Hier sahen wir bei einem Affen, der 14 Tage nach der Impfung getötet worden war, Ganglienzellen mit diffuser Chromatolyse, d. h. regressiven Veränderungen, und bei einem Affen, der 21 Tage gelebt hatte, Ganglienzellen mit zentraler Chromatolyse. Bei guter Darstellung von Nissl-Schollen in der Peripherie (Abb. 10) ist dies ein Bild, das wir als Ausdruck einer Regeneration der Zellen deuten möchten.

Diese grundsätzlich wichtige Feststellung berechtigt in Analogie zu den systematisch durchgeführten Untersuchungen von Bodian über die Frage der Ganglienzellschädigung durch das Poliovirus und deren Fähigkeit zu einer Regeneration zur Annahme, daß viele Ganglienzellen durch den Virusbefall vorübergehend degenerativ geschädigt, aber nicht destruiert bzw. neuronophagiert wurden und sich innerhalb kurzer Zeit wieder erholten.

Die tabellarisch mitgeteilten Versuchsergebnisse lassen erkennen, daß die abgeschwächten Viren von Sabin, und zwar alle drei Typen, weniger neuropathogen sind als die Stämme von Cox, sowohl im klini-

schen wie im histologischen Aspekt. War nach i.c. Inoculation von Typ I kein Unterschied zwischen den Coxschen und Sabinschen Stämmen zu erkennen, so trat doch ein deutlicher Unterschied bei den Affen, die i.sp. inoculiert waren, zutage. Eine erhebliche Differenz ergab sich, wie Tab.2 zeigt, für den Typ II, nicht so erheblich für den Typ III (Tab.3). Hier zeigte sich, daß von 13 mit dem Sabinschen Stamm i.sp. geimpften Affen der spezifische Prozeß zweimal bis zur Zentralwindung aufwärts reichte, während von 13 mit den Cox-Stämmen geimpften Affen fünf spezifische Läsionen in der Zentralwindung aufwiesen.

Ein Vergleich mit den von Murray[10] u. Mitarb. erhobenen Befunden über das Ausmaß der Neuropathogenität der abgeschwächten Poliovirusstämme von Cox ergibt, daß bei unseren Untersuchungen der Typ I zu weniger ausgeprägten histologischen Veränderungen führt, während sich die Befunde mit den Typen II und III ungefähr mit denen von Murray u. Mitarb. decken.

Vergleichen wir unsere Befunde mit denen, die Cabasso[3] mit der Coxschen Vaccine Typ I erhoben hat, so ergibt sich, daß die i.c. Inoculation zu gleichen Ergebnissen geführt hat, während nach i.sp. Inoculation die Veränderungen in unseren Versuchen ausgedehnter waren. Bei dem Typ II fanden wir — entgegen Cabasso — sowohl nach i.c. als auch i.sp. Inoculation stärkere Läsionen. Für den Typ III ist ein Vergleich im Hinblick auf die unvollkommene Darstellung Cabassos nicht möglich. Auch nicht möglich ist ein Vergleich der von uns nach i. m. Inoculation erhobenen Befunde mit denen von Kirschstein und Melnick, da wir niedrigere Virusdosen injiziert haben.

Bei dem Versuch, das Virus aus dem ZNS nach Abschluß der Beobachtungszeit zu isolieren, ergeben sich charakteristische Unterschiede zwischen den Stämmen von Cox und Sabin, wobei die Isolierungsrate mit der histologisch ermittelten Neuropathogenität in etwa parallel geht. Die Untersuchung genetischer Eigenschaften der isolierten Stämme an Hand der Marker d, T und MS zeigt in Einzelfällen nur geringe Veränderungen gegenüber dem Ausgangsmaterial. Hierauf wird an anderer Stelle ausführlich eingegangen werden.

Beim Studium der Antikörperentstehung nach i. c. und i. sp. Inoculation ergab sich kein Unterschied in der Häufigkeit der Bildung von Antikörpern zwischen diesen beiden Impfwegen. Vor allem war keine Abhängigkeit von dem Ausmaß der histologischen Veränderungen im ZNS erkennbar. Die Antikörperbildung war am ausgeprägtesten nach Inoculation von Sabin Typ II, am wenigsten bei Typ III. Wir möchten die Antikörperbildung bei den i. sp. geimpften Affen als Beweis für die Annahme einer Virusvermehrung außerhalb des ZNS werten. Hierfür gibt das histologische Bild bei dem mit Tusche inoculierten Affen eine wichtige Stütze, zeigt sich hier doch, daß die Tusche unmittelbar nach

der i.sp. Injektion in die Liquor- und perivasculären Räume eingedrungen war.

Nach der i.m. Inoculation kam es bei Typ I sowohl von Sabin wie von Cox regelmäßig zu einer Antikörperbildung. Bemerkenswert ist, daß sich bei keinem von diesen Affen jemals eine Virämie nachweisen ließ. Den Affen war am 2., 3. und 4. Tage nach der Impfung Blut entnommen worden. Wenn auch die Möglichkeit, daß eine Virämie vielleicht zu anderer Zeit bestanden hat, nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, so möchten wir doch zur Diskussion stellen, ob es nicht auch ohne Virämie zu einer Antikörperbildung kommen kann. Diese war für die Typ III Stämme sehr unterschiedlich. Während von den sechs mit dem Cox Stamm geimpften Affen nur zwei Antikörper gebildet hatten, fehlten solche völlig bei den mit der Sabinschen Vaccine geimpften Affen. Dabei muß allerdings bemerkt werden, daß der Titer des Sabinschen Stammes niedriger lag als bei dem Stamm von Cox.

Wir sind uns bewußt, daß die am Affen erhobenen Befunde hinsichtlich der Neuropathogenität nach i.c. und i.sp. Inoculation von abgeschwächten lebenden Polioviren nur bedingt in ihrer Wertung auf den Menschen übertragen werden können. Bei diesem ganzen Fragenkomplex ist nicht außer acht zu lassen, daß nach den Untersuchungen von Sabin die Empfänglichkeit des Darmtraktes für das Poliovirus bei Mensch und Affe verschieden ist. Wahrscheinlich gilt gleiches für das ZNS. Bei einem Versuch zu Analogieschlüssen ist vor allem zu berücksichtigen, daß im Affenexperiment der Impfstoff entgegen der oralen Verabreichung beim Menschen in das ZNS inoculiert wird, wobei der bei der i.sp. Injektion gesetzte traumatische Reiz noch besonders gewertet werden muß.

Bemerkenswert ist, daß die Sabinschen Stämme, die nach i.c. Inoculation sich als nicht neuropathogen erwiesen, nach i.m. Impfung Läsionen im ZNS erzeugten, wie aus den Befunden sowohl von Kirschstein als auch von Melnick hervorgeht. Aus unseren eigenen Untersuchungen ist abzuleiten, daß das Cox-Virus Typ I, das nach i.c. Impfung keine Neuropathogenität gezeigt hatte, nach i.m. Verabfolgung histologisch bei zwei von neun Affen Läsionen im ZNS, bei einem von ihnen mit klinischer Auswirkung (Beinparese) erzeugte. Diese Feststellung läßt darauf schließen, daß ein abgeschwächtes Virus sich nach der i.m. Inoculation noch als neuropathogen erweisen kann, wenn es i.c. verabfolgt als nicht neuropathogen bewertet wurde.

In diesem Sinne sprechen auch die vergleichsweise von Kirschstein u. Mitarb. durchgeführten intramuskulären Impfungen mit den Stämmen von Cox, Koprowski und Sabin. Bei dieser Art der Inoculation erwies sich der Typ I von Sabin, Cox und Koprowski mehr neuropathogen als die Typen II und III, was nach der i.c. und i.sp. Impfung nicht der Fall war. Von den Coxschen Stämmen zeigte der Typ II nach

i.sp. und i.c. Impfung eine weit stärkere Neuropathogenität als der Typ I; nach der i.m. Inoculation waren die Ergebnisse umgekehrt.

Eine Erklärung für die Unterschiedlichkeit der Befunde nach i.c. und i.m. Inoculation sehen wir darin, daß mit den beiden Methoden verschiedene Eigenschaften der Viren geprüft werden, das eine Mal ist es die direkte Auswirkung des Virus auf das ZNS, das andere Mal ist zwischen dem Ort der Inoculation und dem ZNS ein Weg geschaltet, auf dem das Virus sich extraneural vermehrt und erst von hier aus das ZNS befallen kann.

Zusammenfassung

Der Grad der Neuropathogenität der abgeschwächten Polio-Virusstämme aller drei Typen von Cox und Sabin, die für die Herstellung einer oralen Vaccine verwendet worden sind, wurde im Affenversuch nach intracerebraler und intraspinaler Inoculation geprüft. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen von Murray[10] und Melnick[7], daß die drei Stämme von Sabin weniger neuropathogen sind als die Stämme von Cox.

Die Virusisolierung aus einzelnen Abschnitten des Zentralnervensystems am Ende der Beobachtungszeit (21 Tage) ging im allgemeinen mit dem histologischen Befund parallel. Diese aus dem ZNS isolierten Stämme zeigten in einigen Fällen Veränderungen der Marker d, T und MS, die jedoch in keinem Fall bis zu dem Verhalten virulenter Stämme gingen.

Die intramuskuläre Inoculation der Stämme Typ I und III von Sabin und Cox ergab, daß von neun geimpften Affen, die mit dem Typ I von Cox geimpft worden waren, zwei typische Läsionen im ZNS aufwiesen (einer davon hatte Paresen einer hinteren Extremität). Nach Inoculation der anderen Stämme konnte kein pathologischer Befund im Zentralnervensystem der Tiere festgestellt werden. Bei keinem der intramuskulär geimpften Tiere ließ sich eine Virämie nachweisen. Eine Antikörperbildung nach der intramuskulären Inoculation der Stämme Typ I von Sabin und Cox konnte in beiden Tiergruppen gleich häufig beobachtet werden. Während von sechs mit dem Typ III von Cox geimpften Affen zwei Antikörper gebildet hatten, ließen sich bei keinem der mit dem Typ III von Sabin geimpften Tiere Antikörper nachweisen.

Abschließend werden die Möglichkeiten einer Bestimmung der Neuropathogenität abgeschwächter Polio-Virusstämme im Affenversuch, vor allem die Möglichkeit einer Übertragung der Versuchsergebnisse auf den Menschen, diskutiert.

Literatur

[1] Bodian, D.: The virus, the nerve cell and paralysis. Bull. John Hopk. Hosp. **83**, 1—107 (1948).

[2] Bodian, D.: In Rivers-Horsfall: Viral and Rickettsial Infections of Man, Lippincot., p. 479.

[3] Cabasso, V. J.: Persönliche Mitteilung.
[4] Fifth International Poliomyelitis Conference. Excerpta med. (Amst.) International Congress, Series No. 27.
[5] Hsiung, G. D., and J. L. Melnick: Plaque formation with poliomyelitis, Coxsackie and orphan (ECHO) viruses in bottle cultures of monkey epithelial cells. Virology **1**, 533 (1955).
[6] Kirchstein, R., S. Baron, G. S. Vorman, R. Murray, F. T. Perkins and G. Hottle: Neurovirulence of Attenuated Type I Poliovirus Vaccine Strains after Intramuscular Inoculation of Rhesus Monkeys. Virology **11**, 300—302 (1960).
[7] Live Poliovirus Vaccines, First International Conference Washington, Pan American Sanitary Bureau Scientific Publication No. 44 (1959).
[8] Live Poliovirus Vaccines, Second International Conference Washington, Pan American Sanitary Bureau Scientific Publication No. 50 (1960).
[9] Melnick, J. L.: Problems associated with the use of live Poliovirus Vaccine. Amer. J. Publ. Hlth. **50**, 1012—1032 (1960).
[10] Murray, R., R. Kirschstein, G. van Hoolier and S. Baron: Comparative Virulence for Rhesus Monkeys of Poliovirus Strains used for oral Administration. Live Poliovirus Vaccines First International Conference Washington, Pan American Sanitary Bureau Scientific Publication No. **44**, 39—65 (1959).
[11] Reed, L. J., and H. Muench: Amer. J. Hyg. **27**, 493 (1938).
[12] Salk, J., J. S. Youngner and W. Ward: Use of Change of Phenol Red as the Indicator in Titrating Poliomyelitis Virus or its Antibody in a Tissue Culture System. Amer. J. Hyg. **60**, 214—230 (1954).

Professor Dr. H. Pette,
Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52

Zeitschrift f. Hygiene 148, 193—200 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Köln
(Direktor: Prof. Dr. F. Lentze)

In vitro-Untersuchungen zur Fermentausstattung * von Enterokokken

Von
G. Pulverer und D. Gröschel

(Eingegangen am 21. Oktober 1961)

Wie bekannt, kommen Enterokokken nicht nur im Gastrointestinal-Trakt, ihrem physiologischen Standort, sondern auch in den verschiedensten Krankheitsprozessen vor. Welche pathogene Bedeutung haben nun Enterokokken: können sie als hauptsächliche Träger einer Infektion angesehen werden, oder sind sie lediglich harmlose Begleitbakterien? Unseres Wissens ist diese Fragestellung bis heute offen geblieben, zur Beantwortung fehlen vor allem experimentelle Untersuchungen über die Ausstattung der Enterokokken mit den zur Zeit bekannten Pathogenitätsmerkmalen sowie systematische Tierversuche.

Bei Durchsicht des Schrifttums** fällt auf, daß zwar eine Vielzahl von Fermentleistungen geprüft worden ist, meist jedoch nur im Hinblick auf Taxonomie und Unterteilung der Enterokokken- bzw. Streptokokkengruppen. Aufgabe dieser Mitteilung soll daher sein, über eigene in vitro-Untersuchungen zum Nachweis von für Pathogenität bzw. Virulenz bedeutsamen Fermenten bei Enterokokken zu berichten. Resistenzprüfungen gegen die heute gebräuchlichen Antibiotica folgen in einer zweiten Arbeit, tierexperimentelle Beobachtungen bleiben einer späteren Mitteilung vorbehalten.

Herkunft und Differenzierung der Enterokokkenstämme

Insgesamt 115 Enterokokkenstämme wurden aus unterschiedlichen Einsendungen unseres Institutes isoliert: aus Untersuchungsproben von pathologischen und physiologischen Fundorten beim Menschen, aus Muttermilch- und Oberflächenwasserproben. Über die genaue Herkunft der Stämme gibt Tab. 1 Auskunft.

Serologisch konnten alle 115 Stämme eindeutig der *Lancefield-Gruppe D* zugeordnet werden.

Eine weitere Differenzierung der Stämme erfolgte dann mit Hilfe der von Guthof 1951 [4a] und später von Guthof u. Winkler [6] in unserem Institut besonders für die Enterokokkendiagnostik entwickelten *Selenit-Indicatorplatte* sowie der Clauberg-III-Platte und des Hammelblutagars.

* Herrn Prof. Dr. W. Kikuth zum 65. Geburtstag gewidmet.
** 2–6,8a,8b,9,10a,11,13,16–20,22,23.

Sieht man von zwei Liquefaciens-Stämmen ab, welche auf der Selenitplatte den für Liquefaciens-Strept. typischen Aufhellungshof rund um die Kolonien vermissen ließen, so konnten die Stämme bereits mittels

Tabelle 1. *Herkunft der 115 Enterokokkenstämme*

Herkunft	Str. faecalis var. faecalis	Str. faec. var. liqu.	Str. faecium
cervico-faciale Aktinomykose	—	3	—
Luftwege	6	6	—
Ohr	3	—	—
Galle	3	1	1
Nabelabstrich bei Säuglingen	4	—	—
Wundabstrich	9	3	1
Abszeßeiter	8	3	—
Urin	15	10	—
Stuhl	9	4	19
Oberflächenwasser (See)	—	—	4
Muttermilch	3	—	—
Gesamtzahl der Stämme	60	30	25

Tabelle 2. *Kohlenhydratspaltung der 115 Enterokokkenstämme*

Art	Anzahl der Stämme	Äsk.	Man.	Glyc.	Sorb.	Arab.
Str. faecalis var. faecalis (60 Stämme)	59	+	+	+	+	—
	1	+	+	+	—	+
Str. faecalis var. liquefaciens (30 Stämme)	28	+	+	+	+	—
	1	+	+	+	—	—
	1	+	+	+	+	+
Str. faecium (25 Stämme)	12	+	+	—	—	+
	9	+	—	—	—	—
	2	+	—	—	—	+
	1	+	+	+	—	—
	1	+	+	—	+	+

+ = Spaltung mit Säurebildung.
— = Negativ.

dieser drei Nährböden differenziert werden: 60 bzw. 30 Enterokokkenstämme fielen auf die telluritresistenten Arten Str. faecalis var. faecalis bzw. Str. faecalis var. liquefaciens, und 25 Stämme gehörten zum telluritempfindlichen Str. faecium.

Die Prüfung des *Kohlenhydratabbaus* wurde mit der bei uns im Routinebetrieb üblichen abgekürzten „Zuckerreihe" (Äskulin, Mannit, Glycerin, Sorbit, Arabinose) durchgeführt. Dabei konnten, wie aus Tab. 2 ersichtlich, bei den Faecalis-Stämmen vier und bei den Faecium-Stämmen fünf verschiedene biochemische Typen festgestellt werden.

Eigene Untersuchungen

1. Oxydationsfermente. a) Cytochromoxydase[1]: auf zweitägige Oberflächenkolonien wurde eine 1%ige Lösung von Dimethyl-p-phenylendiaminhydrochlorid aufgetropft und bis zu 30 min beobachtet.

b) Katalase[1]: mit einem Glasstab wurde etwas Koloniemasse in 1%iges Wasserstoffsuperoxyd eingerieben.

c) Peroxydase[1]: das Zentrifugat einer zweitägigen Bouillonkultur wurde in 0,3 ml einer gesättigten Benzidin-Eisessiglösung aufgeschwemmt und mit 0,3 ml einer 3%igen Wasserstoffsuperoxydlösung versetzt. Beobachtungszeit 30 min.

Ergebnisse. Bei keinem der 115 Enterokokkenstämme konnte eines der genannten Oxydationsfermente nachgewiesen werden.

2. Dextran- bzw. Lävanbildung. Alle 115 Enterokokkenstämme wurden auf festen, 15 davon auch in flüssigen Saccharosenährmedien (5%ig) bei 22° C, 37° C und 40° C gezüchtet und auf Dextran- bzw. Lävanbildung geprüft.

Ergebnis. Polysaccharide wurden in keinem Falle nachgewiesen.

3. Lipasen. Alle Stämme wurden auf Eigelb-Agarplatten (Zusammensetzung siehe [7]) 2 Tage bei 37° C bebrütet. Zur Kontrolle wurde ein lipasepositiver Staphylokokkenstamm mitgeführt.

Ergebnis. Fettspaltende Eigenschaften konnten nicht festgestellt werden.

4. Hämotoxine. Auf 8%igen Hammelblutagarplatten wurden sowohl Oberflächen- als auch Tiefenkolonien auf Hämotoxin-Bildung geprüft. Die Endablesung erfolgte nach achttägiger aerober, anaerober oder CO_2-angereicherter Bebrütung bei 37° C.

Ergebnis. Oberflächenkolonien der Str. faecalis-Stämme zeigten bei aerober Bebrütung meist keine Veränderungen des Blutnährbodens, bei anaerober oder CO_2-angereicherter Kultivierung kam es oft nach anfänglicher Vergrünung zu Aufhellungshöfen. Bei Tiefenkolonien konnten dieselben Aufhellungshöfe beobachtet werden.

Oberflächen- und Tiefenkolonien der Str. faecium-Stämme ließen stets — unabhängig vom Bebrütungsmodus — eine mehr oder weniger deutliche α-Hämolyse erkennen, die bei längerer Bebrütung gelegentlich in α′-Hämolyse (Seelemann) überging.

5. Gerinnungsgifte. *a) Plasmakoagulasen.* Zuerst wurden alle Stämme auf Objektträgeragglutination mit Menschen-* und Kaninchenplasma geprüft. Anschließend erfolgte der Röhrchentest im Wasserbad bei 37° C mit Menschen-, Kaninchen- und Hammelplasma (0,5 ml 1:3 verdünntes Oxalat- oder Citratplasma + 0,3 ml einer 18stündigen Bouillonkultur). Physiologische Kochsalzlösung und ein plasmakoagulasepositiver Staphylokokkenstamm liefen als Kontrollen mit.

Ergebnis. Die Objektträgeragglutination war bei 80 der 115 Enterokokkenstämme positiv, 17 Stämme agglutinierten spontan, bei den restlichen 18 Stämmen war das Ergebnis negativ.

Die Resultate des Röhrchentestes sind aus der Tab. 3 zu ersehen:

Alle 115 getesteten Enterokokkenstämme bildeten Plasmakoagulasen. Am empfindlichsten erwies sich auch hier, wie bei den Staphylokokken, das Kaninchenplasma; die zur Verklumpung benötigte Reaktionszeit ist jedoch im Vergleich mit den Staphylokokken länger. Menschen- und Hammelplasma sind deutlich weniger empfindlich. Besonderheiten

* Dazu verwendeten wir lyophilisiertes Humanplasma „Probhemo", für dessen Überlassung wir der Fa. Choay, Paris, zu danken haben.

bezüglich der Herkunft der Stämme sowie Unterschiede zwischen Citrat- und Oxalatplasma konnten nicht festgestellt werden.

b) Fibrinolysine. Die Untersuchung wurde mit recalcifiziertem Citrat- und Oxalatplasma von Mensch, Hammel und Kaninchen durchgeführt (1,0 ml 1:5 verdünntes Plasma + 0,5 ml 18stündige Bouillonkultur + 0,25 ml einer 0,25%igen $CaCl_2$-Lösung). Als Kontrolle dienten physiologische Kochsalzlösung und ein hämolysierender Streptokokkenstamm der Gruppe A.

Tabelle 3. *Plasmakoagulation bei Enterokokken*

	Reaktionszeit in Stunden	Zahl der positiven Stämme mit Plasma von		
		Mensch	Hammel	Kaninchen
Str. faecalis	2	6	5	39
var. faecalis	4	41	45	59
(60 Stämme)	8	58	58	60
	20	59	59	60
Str. faecalis	2	3	3	25
var. liquefaciens	4	22	29	29
(30 Stämme)	8	30	30	30
Str. faecium	2	3	6	17
(25 Stämme)	4	9	13	24
	8	20	20	25
	20	22	21	25
NaCl-Kontrolle	20	neg.	neg.	neg.
Staph.-Kontrolle	2	pos.	pos.	pos.

Ergebnis. Fibrinolyse trat auch nach 20stündiger Bebrütung bei 37° C im Wasserbad nicht ein.

6. Depolymeridasen. Entsprechend den Staphylokokkenuntersuchungen versuchten wir, Depolymeridasen bei Enterokokken im Dekapsulationstest nachzuweisen. Als „kapseltragende" Testbakterien verwendeten wir neben zwei mukösen A- und C-Streptokokkenstämmen das von Oehring[11] bei Staphylokokken erprobte Bacterium anitratum. Abgelesen wurde nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C; als Kontrolle wurde ein hyaluronidasepositiver Staphylokokkenstamm mitgeprüft.

Ergebnis. Während bei der Faecium-Gruppe keine Depolymeridasen nachzuweisen waren, beobachteten wir bei einem Teil der Enterokokken aus der Faecalis-Gruppe eine Dekapsulation: elf von 30 Liquefaciens- und fünf von 60 Faecalisstämmen entkapselten die beiden mukösen Streptokokkenstämme, jedoch nicht das Bacterium anitratum. Interessanterweise bildete weiter ein Faecalisstamm Depolymeridasen nur für das Bacterium anitratum, nicht aber für die Streptokokken, ein anderer Faecalisstamm entkapselte sogar alle drei Testbakterien.

Die sieben depolymeridasepositiven Faecalisstämme wurden aus folgendem Material kultiviert: zweimal Stuhl, einmal Muttermilch, einmal Katheter-Urin und dreimal Wundmaterial.

Die elf depolymeridasepositiven Liquefaciens-Stämme züchteten wir aus: Stuhl (einmal), Galle (einmal), Katheter-Urin (zweimal), Sputum (einmal) und Wundmaterial (sechsmal).

7. Proteolytische Fermente. *a) Gelatinasen.* Gelatineröhrchen wurden mit reichlich Kulturmaterial beimpft und 8 Tage bei 37° C bebrütet.

Ergebnis. Gelatineverflüssigung trat nur bei Enterokokken des Str. faecalis var. liquefaciens auf. Meist war die Gelatine schon nach 24stündiger Bebrütung vollkommen verflüssigt.

b) Milchgerinnung und Molkenabscheidung. Entrahmte, filtrierte und autoklavierte Frischmilch wurde mit den 115 Stämmen beimpft und bei 37° C bebrütet. Abgelesen wurde täglich, Endablesung erfolgte nach 8 Tagen.

Ergebnis. Alle 115 Enterokokken-Stämme bewirkten eine Milchgerinnung: besonders stark und schnell die Liquefaciens- und drei der Faecalisstämme (schon nach 24stündiger Bebrütung), alle anderen Stämme benötigten 2—4 Tage.

Molkenabscheidung konnte nur bei den Liquefaciens-Stämmen und den drei obigen, stark milchgerinnenden Faecalis-Enterokokken nach 24 Std, spätestens nach 2 Tagen beobachtet werden.

Besprechung der Ergebnisse

Die zu unseren Untersuchungen herangezogenen Enterokokkenstämme stellen bezüglich ihrer Herkunft, ihres Verhaltens auf der Selenit-Indicatorplatte nach Guthof und ihrer Kohlenhydratspaltung eine repräsentative Auswahl der in jedem Untersuchungsamt anfallenden Enterokokken dar. Sie sind daher mit den von anderen Autoren* untersuchten Stämmen vergleichbar.

Unsere in vitro-Untersuchungen zur Ausstattung der Enterokokken mit für Pathogenität bzw. Virulenz bedeutsamen Fermenten zeigten, daß Oxydationsfermente wie Cytochromoxydasen, Katalasen und Peroxydasen fehlen; da Enterokokken fakultativ anaerobe Milchsäurebildner sind[17], werden dieselben offenbar nicht benötigt. Dextran- bzw. lävanbildende Fermente gehen ihnen, wie schon von Guthof u. Winkler beobachtet, ebenfalls ab. Lipasen und, entsprechend den Angaben anderer Autoren**, fibrinolytische Fähigkeiten konnten nicht nachgewiesen werden.

Hämotoxine waren bei unseren telluritresistenten Stämmen nicht vorhanden, wohl aber bei allen telluritempfindlichen Faecium-Enterokokken (α-Hämolyse bzw. nach längerer Bebrütung α'-Hämolyse).

Die Eigenschaft der Enterokokken, Citrat- oder Oxalatplasma zu verklumpen, war uns schon früher bei routinemäßigen Laboruntersuchungen aufgefallen. Des öfteren traten deshalb bei der Erkennung

* 4–6,8a,11,13,16,18a,18b,19,22.

** 2,15,16,18a,21.

junger Staphylokokkenkolonien sogar differentialdiagnostische Schwierigkeiten auf. In der Literatur fanden wir einen Bericht von Evans u. Mitarb.[3] über „falsch positive Ergebnisse" der Citratplasmakoagulation nach Chapman durch Enterokokken beim Nachweis von Staphylokokken in Nahrungsmitteln. Diese Autoren führten die Plasmakoagulation auf die citratspaltenden Fähigkeiten der D-Streptokokken zurück, da hierdurch Calcium-Ionen wieder frei würden und somit eine Spontanagglutination eintreten könnte. Dieser Ansicht wurde bereits 1959 von Wood[23] in einer ausführlichen Arbeit widersprochen. Auch wir konnten nachweisen, daß allen Enterokokkenstämmen die Fähigkeit zukommt, Citrat- und Oxalatplasma von Mensch, Hammel und Kaninchen im Röhrchentest zu verklumpen, wenn auch weniger rasch als pathogene Staphylokokken. Das Kaninchenplasma erwies sich in seiner Empfindlichkeit hierbei den anderen Plasmaarten überlegen. Gegen die Argumente von Evans u. Mitarb. spricht auch, daß bei den von uns geprüften Enterokokken-Stämmen keine Citratspaltung nachzuweisen war und die meisten der Stämme Plasma im Objektträgertest agglutinierten.

Das Vorkommen proteolytischer Fermente bei den Enterokokken ist bei ihrem physiologischen Standort im Darm nicht erstaunlich und auch schon länger bekannt*. Nach unseren Befunden scheinen jedoch die Faecium-Stämme nur schwache Proteasen-Bildner zu sein, eine Milchgerinnung war meist erst nach viertägiger Bebrütung festzustellen. Fast alle Faecalis-Enterokokken brachten die Milch schon nach zweitägiger Bebrütung zur Gerinnung, drei von ihnen sogar nach nur 24 Std unter Molkenbildung.

Über die stärksten proteolytischen Fermente verfügen zweifelsohne die Liquefaciens-Stämme: alle produzierten Gelatinasen, und die Milchgerinnung trat stets bereits nach 24 Std unter Molkenabscheidung auf. Bei den drei genannten, ebenfalls molkenabscheidenden Faecalis-Stämmen, welche trotz mehrmaliger Wiederholung keine Gelatine verflüssigten, dürfte es sich unseres Erachtens um Übergangsformen zwischen Str. faecalis var. faecalis und Str. faecalis var. liquefaciens handeln.

Für die Pathogenität besonders bedeutsam ist zweifellos der Nachweis von Depolymeridasen bei einem Teil der Faecalis-Gruppe: bei sieben von 60 Str. faecalis- und bei elf von 30 Str. faecalis var. liquefaciens-Stämmen. Für eine Multiplizität dieser Fermente spricht, daß die meisten Enterokokken nur die mukösen A- und C-Streptokokken, nicht aber das Bact. anitratum angriffen, demgegenüber einer der Faecalisstämme lediglich das Bact. anitratum, ein weiterer sogar alle drei kapselbildenden Bakterienarten entkapselte. Interessant ist weiterhin, daß es uns in keinem Falle gelang, bei den untersuchten Str. faecium-Stämmen Depolymeridasen festzustellen.

* 6,8a,16,18a,18b,19,20.

Auf Grund ihrer Ausstattung mit für Pathogenität bzw. Virulenz bedeutsamen Fermenten (Hämotoxine, Proteasen, Plasmakoagulasen und Depolymeridasen) ist zu erwarten, daß Enterokokken *fakultativ-pathogene* Eigenschaften besitzen können. Klinische Beobachtungen bestätigen jedoch, daß offenbar von Stamm zu Stamm Virulenzunterschiede bestehen. Den am besten mit Fermenten ausgestatteten Stämmen der Liquefaciens-Gruppe kommt wohl die größte Virulenz zu, während die Faecium-Gruppe nur geringe klinische Bedeutung besitzt. Vielleicht könnte das Fehlen von Depolymeridasen in dieser Gruppe erklären, warum der Strept. faecium nur selten an pyogenen Prozessen beteiligt ist.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Beobachtungen von Guthof[4b], daß bei obstipierten Greisen der Str. liquefaciens in der Stuhlflora dominiert. Seine Untersuchungen der Darmstreptokokken ergaben ferner, daß beim gesunden Brustkind Str. faecalis vorherrscht, und erst nach Umstellung auf Zwiemilch- und Kuhmilchernährung Str. faecium nachzuweisen ist, der ja später den Hauptteil der Darmstreptokokken ausmacht. Zur Erklärung für die fast reine Faecalis-Besiedlung beim muttermilchernährten Säugling dürften die von einem von uns (Pulverer) erhobenen Befunde von 242 Muttermilchproben beitragen: in 144 dieser Proben wurde Str. faecalis (darunter 27 Liquefaciensstämme) nachgewiesen, jedoch in keiner Str. faecium.

Zusammenfassung

Nach eingehender serologischer und biochemischer Differenzierung wurde bei 115 Enterokokkenstämmen in vitro nach Pathogenitätsmerkmalen gesucht. Oxydationsfermente wie Cytochromoxydasen, Katalasen und Peroxydasen fehlten, ebenso Lipasen, Fibrinolysine und dextran- bzw. lävanbildende Fermente. Hämotoxine bildeten nur die telluritempfindlichen Str. faecium-Stämme.

Bei allen 115 Stämmen konnten Plasmakoagulasen und proteolytische Fermente, bei einem Teil der Faecalis- und Liquefaciens-Gruppe auch Depolymeridasen nachgewiesen werden.

Die fakultativ-pathogene Bedeutung der Enterokokken sowie Virulenzunterschiede zwischen den Gruppen bzw. Stämmen wurden diskutiert.

Literatur

[1] Berger, U.: Oxydationsfermente bei Veillonella alcalescens. Z. Hyg. Infekt-Kr. **146**, 440 (1960).

[2] Christensen, L. R.: Factors influencing streptococcal fibrinolysin and fibrinolysis. J. infect. Dis. **66**, 278 (1940); ref.: Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **139**, 239 (1941).

[3] Evans, J. B., L. G. Buettner and C. F. Niven: Occurence of streptococci that give a false-positive coagulase test. J. Bact. **64**, 433 (1952).

[4a] Guthof, O.: Die Selenit-Indikator-Platte, ein Hilfsmittel zur Differenzierung von Streptokokken. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **158**, 87 (1951).

[4b] Guthof, O.: Streptokokken und Dysbakterie-Problem. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **170**, 327 (1957/58).

[5] Guthof, O., u. G. Dammann: Über die Brauchbarkeit von Enterokokken-Testen zur Beurteilung von Trinkwasser und Oberflächenwasser. Arch. Hyg. (Berl.) **142**, 559 (1958).

[6] Guthof, O., u. F. Winkler: Enterokokken-Diagnostik mit der Selenit-Indikator-Platte. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **162**, 236 (1955).

[7] Grün, L., u. G. Pulverer: Ergebnisse einer Differenzierung von Staphylokokken des Phagtyps „80". Z. Hyg. Infekt.-Kr. **146**, 385 (1960).

[8a] Klinge, K.: Enterokokken, D-Streptokokken, Streptococcus faecalis. Schweiz. Z. Path. **15**, 281 (1952).

[8b] Klinge, K.: Die Toxine der hämolytischen Streptokokken: Streptolysin O und Streptolysin S, zugleich ein Beitrag zur Hämolyse der D-Streptokokken (Enterokokken). Arch. Hyg. (Berl.) **139**, 12 (1955).

[9] Koch, Fr.: Enterokokkenstudien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **134**, 348 (1935).

[10a] Meyer, K.: Über hämolytische Enterokokken. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **99**, 416 (1926).

[10b] Meyer, K.: Zur experimentellen Erzeugung und Umwandlung von Enterokokkenformen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **129**, 106 (1933).

[10c] Meyer, K.: Der Enterococcus als Artindividualität. Z. Hyg. Infekt-Kr. **118**, 204 (1936).

[11] Mieth, H.: Untersuchungen über das Vorkommen von Enterokokken bei Tieren und Menschen .I. und II. Mitteilung. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **179**, 456 (1960); **183**, 68 (1961).

[12] Neter, E., and E. Witebsky: Fibrinolytic activity of hemolytic streptococci and other microorganisms. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **34**, 549 (1936).

[13] Nyman, O. H.: Studies in enterococci. Acta Path. Microbiol. Scand., Supp. LXXXIII. Malmö: Landby & Lundgren 1949.

[14] Oehring, H.: Die Verwendung des Bact. anitratum zum Nachweis der Hyaluronidase bei Staphylokokken. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **176**, 59 (1959).

[15] Schmidt, H.: Beiträge zur Kenntnis der hämolytischen Streptokokken und der Eigenschaften des Antistreptokokkenserums. I. Die Fibrinolyse der Streptokokken. Z. Immun.-Forsch. **87**, 1 (1936).

[16] Seelemann, M.: Biologie der Streptokokken. Nürnberg: Hans Carl 1954.

[17] Seeley, H. W., and P. J. Vandemark: An adaptive peroxydation by streptococcus faecalis. J. Bact. **61**, 27 (1951).

[18a] Sherman, J. M.: The streptococci. Bact. Rev. **1**, 1 (1937).

[18b] Sherman, J. M.: The enterococci and related streptococci. J. Bact. **35**, 81 (1938).

[19] Sherman, J. M., J. C. Mauer and P. Stark: Streptococcus faecalis. J. Bact. **33**, 275 (1937).

[20] Sherman, J. M., P. Stark and J. C. Mauer: Streptococcus zymogenes. J. Bact. **33**, 483 (1937).

[21] Tillett, W. S.: The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci in relation to the source of strains and to cultural reactions. J. Bact. **29**, 11 (1935).

[22] Wagner, V.: Die Schwierigkeiten der biologischen Enterokokkendiagnose. Schweiz. Z. allg. Path. **13**, 15 (1950).

[23] Wood, M.: The clotting of rabbit plasma by group D Streptococci. J. gen. Microbiol. **21**, 385 (1959).

Dr. G. Pulverer,
Hygiene-Institut der Universität, Köln-Lindenthal, Fürst Pückler-Straße 56

Zeitschrift f. Hygiene 148, 201—207 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Köln
(Direktor: Prof. Dr. F. Lentze)

Die in vitro-Empfindlichkeit von Enterokokken * gegen die gebräuchlichen Antibiotica

Von
D. Gröschel und G. Pulverer

(Eingegangen am 21. Oktober 1961)

Im ersten Beitrag[11] konnte experimentell belegt werden, daß Enterokokken über einige der derzeit bekannten Pathogenitätsfaktoren verfügen können: Hämotoxine, Plasmakoagulasen, proteolytische Fermente und Depolymeridasen. Es ist daher anzunehmen, daß Enterokokken sehr wohl in der Lage sind, außerhalb ihres natürlichen Standorts pyogene Infektionsprozesse zu verursachen oder wenigstens zu unterhalten. Erinnert sei in diesem Zusammenhang nur an die nicht seltene Enterokokken-Endokarditis (nach amerikanischen Autoren 5—15% aller bakteriellen Endokarditiden) und an ihre häufige Beteiligung an Infektionen des Urogenitaltraktes bzw. des Bauchraums.

Unterlagen über die Empfindlichkeit von Enterokokken gegen die derzeit gebräuchlichen Antibiotica sind daher von praktischem Wert. Bei Durchsicht des uns zugänglichen Schrifttums fällt nun auf, daß zwar Testungen gegen einzelne Antibiotica vorliegen; es fehlt jedoch ein umfassendes Resistenzbild unter Berücksichtigung der neueren Präparate und einer größeren, repräsentativen Zahl von Enterokokken-Stämmen.

Die ausführlichsten Angaben in der Literatur beziehen sich auf Penicillin[2,5,6,8–10]: die meisten Hemmwerte liegen bei 1,0 γ und darüber, so daß Penicillin übereinstimmend als nur wenig Enterokokken-wirksam bezeichnet wurde. Auf eine hohe Streptomycin-Resistenz der Enterokokken wurde ebenfalls bereits hingewiesen[6,8,10]. Gourevitch u. Mitarb. gaben die bakteriostatische Hemmdosis von Kanamycin gegen Str. faecalis mit 32,0 γ/ml an, Welch u. Mitarb. sogar mit 31,2—250,0 γ/ml. Auch nach Hofmann u. Mitarb. erscheint die therapeutische Anwendung von Kanamycin bei Enterokokkeninfektionen als aussichtslos. Nebacetin wird von Hein als gut Enterokokken-wirksames Lokalantibioticum empfohlen. Während Koenig u. Kaye noch Chlortetracyclin-Hemmwerte ihrer sechs Stämme zwischen 0,8 und 3,1 γ/ml fanden, weist Linzenmeier auf einen bereits beachtenswerten Anteil von Tetracyclin-resistenten Enterokokken hin. Letzterer berichtet weiterhin über eine gute Empfindlichkeit gegen Chloramphenicol und Erythromycin (auch [7]).

In der folgenden Mitteilung sollen daher eigene Untersuchungen zur in vitro-Empfindlichkeit von 113 Enterokokken-Stämmen gegen Penicillin, Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Erythromycin,

* Herrn Prof. Dr. W. Kikuth zum 65. Geburtstag gewidmet.

Oleandomycin, Inamycin, Selectomycin, Polymyxin B, Colistin, Kanamycin, Viomycin und Nebacetin mitgeteilt werden*.

Material und Methodik

Die untersuchten Enterokokken sind mit den bereits in der früheren Arbeit biochemisch, serologisch und fermentativ geprüften Stämmen (siehe [11]) identisch. Die 113 Enterokokkenstämme gehören also serologisch zur Lancefield-Gruppe D und können biochemisch in drei *Untergruppen* eingeordnet werden:

Str. faecalis var. faecalis	60 Stämme
Str. faecalis var. liquefaciens	30 Stämme
Str. faecium	23 Stämme

Die Stämme wurden aus folgenden natürlichen Fundorten und pathologischen Entzündungsprozessen isoliert:

Eiterprozesse	35 Stämme
Harnwege	25 Stämme
Respirationstrakt	12 Stämme
Galle	5 Stämme
Stuhl	32 Stämme
Oberflächenwasser (See)	4 Stämme

Als Reihenverdünnungsmethode wurde des geringeren Material- und Arbeitsaufwandes wegen der *Plattentest* verwendet: dem im Wasserbad auf 47° C abgekühlten Agar-Nährboden wurden frisch bereitete Lösungen der zu prüfenden Mittel in fallenden Mengen zugesetzt und das Nährboden-Antibiotica-Gemisch nach kräftigem Durchmischen in Petri-Schalen ausgegossen.

Nach Beimpfung wurden die Kulturen 24 Std bei 37° C bebrütet. Zur Kontrolle liefen stets beimpfte Agarplatten ohne Antibioticazusatz mit.

Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen werden im folgenden tabellarisch zusammengestellt:

Tabelle 1. *Penicillin, Tetracyclin, Erythromycin*

	Art und Anzahl der Stämme	Hemmung	gamma Antibioticum/ml Nährboden					
			0,1	0,5	1,0	5,0	10,0	>10,0
Penicillin	S. faecalis	beginnend	6	6	48			0
	60 Stämme	vollkommen		1	5	53		1
	S. faecalis var. liquef.	beginnend	2		28			0
	30 Stämme	vollkommen			5	25		0
	S. faecium	beginnend	5	8	10			0
	23 Stämme	vollkommen		1	5	14	3	0
Tetracyclin	S. faecalis	beginnend	8	21	1		5	25
	60 Stämme	vollkommen			7	23		30

* Für die Überlassung von Testsubstanzen danken wir der Chemie Grünenthal GmbH, Stolberg/Rhld.

Tabelle 1 (Fortsetzung)

	Art und Anzahl der Stämme	Hemmung	gamma Antibioticum/ml Nährboden					
			0,1	0,5	1,0	5,0	10,0	>10,0
Tetracyclin	S. faecalis var. liquef. 30 Stämme	beginnend	2	9			2	17
		vollkommen			6	5		19
	S. faecium 23 Stämme	beginnend	11	11				1
		vollkommen			17	5		1
Erythromycin	S. faecalis 60 Stämme	beginnend	3	35	7		1	2
		vollkommen	2	11	25	19		3
	S. faecalis var. liquef. 30 Stämme	beginnend	1	11	4	1		2
		vollkommen		10	7	9		4
	S. faecium 23 Stämme	beginnend	9	10	4			0
		vollkommen	4	6	2	11		0

Tabelle 2. *Streptomycin, Selectomycin, Chloramphenicol, Oleandomycin*

	Art und Anzahl der Stämme	Hemmung	gamma Antibioticum/ml Nährboden					
			0,5	1,0	5,0	10,0	50,0	>50,0
Streptomycin	S. faecalis 60 Stämme	beginnend				1	10	49
		vollkommen					1	59
	S. faecalies var. liquef. 30 Stämme	beginnend					10	20
		vollkommen						30
	S. faecium 23 Stämme	beginnend					14	9
		vollkommen					1	22
Selectomycin	S. faecalis 60 Stämme	beginnend	1	2	47	4	1	2
		vollkommen			1	45	11	3
	S. faecalis var. liquef. 30 Stämme	beginnend		2	20	5		3
		vollkommen				20	7	3
	S. faecium 23 Stämme	beginnend		1	22			0
		vollkommen				11	12	0
Chloramphenicol	S. faecalis 60 Stämme	beginnend	2	42	9	7		0
		vollkommen			17	36	4	3
	S. faecalis var. liquef. 30 Stämme	beginnend		21	9			0
		vollkommen			5	25		0
	S. faecium 23 Stämme	beginnend		22	1			0
		vollkommen			17	6		0

Tabelle 2 (Fortsetzung)

	Art und Anzahl der Stämme	Hemmung	gamma Antibioticum/ml Nährboden					
			0,5	1,0	5,0	10,0	50,0	>50,0
Oleandomycin	S. faecalis 60 Stämme	beginnend		53	1		1	2
		vollkommen	1		51	5		3
	S. faecalis var. liquef. 30 Stämme	beginnend		25	1			3
		vollkommen			26	1		3
	S. faecium 23 Stämme	beginnend		21	2			0
		vollkommen			20	3		0

Tabelle 3. *Kanamycin, Viomycin, Inamycin, Polymyxin B*

	Art und Anzahl der Stämme	Hemmung	gamma Antibioticum/ml Nährboden					
			1,0	5,0	10,0	50,0	100,0	>100,0
Kanamycin	S. faecalis 60 Stämme	beginnend	2	1	14	36	4	3
		vollkommen				11	40	9
	S. faecalis var. liquef. 30 Stämme	beginnend			5	24	1	0
		vollkommen				2	23	5
	S. faecium 23 Stämme	beginnend		1	11	4	4	3
		vollkommen				6	5	12
Viomycin	S. faecalis 60 Stämme	beginnend					6	54
		vollkommen						60
	S. faecalis var. liquef. 30 Stämme	beginnend						30
		vollkommen						30
	S. faecium 23 Stämme	beginnend					7	16
		vollkommen						23
Inamycin	S. faecalis 60 Stämme	beginnend	57	3				0
		vollkommen		54	6			0
	S. faecalis var. liquef. 30 Stämme	beginnend	29	1				0
		vollkommen		27	3			0
	S. faecium 23 Stämme	beginnend	23					0
		vollkommen	15	8				0
Polymyxin B	S. faecalis 60 Stämme	beginnend						60
		vollkommen					6	54
	S. faecalis var. liquef. 30 Stämme	beginnend						30
		vollkommen					2	28
	S. faecium 23 Stämme	beginnend					1	22
		vollkommen						23

Tabelle 4. *Colistin und Nebacetin*

	Art und Anzahl der Stämme	Hemmung	Einheiten Antibioticum/ml Nährboden					
			10	50	100	500	1000	>1000
Colistin	S. faecalis 60 Stämme	beginnend					2	58
		vollkommen					3	57
	S. faecalis var. liquef. 30 Stämme	beginnend					2	28
		vollkommen						30
	S. faecium 23 Stämme	beginnend					1	22
		vollkommen						23

	Art und Anzahl der Stämme	Hemmung	Einheiten Neomycin/ml Nährboden und					
			1	5	10	50	100	
			Einheiten Bacitracin/ml Nährboden					
			0,25	1,25	2,5	12,5	25	res.
Nebacetin	S. faecalis 60 Stämme	beginnend	4	43	13			0
		vollkommen		10	15	35		0
	S. faecalis var. liquef. 30 Stämme	beginnend	2	21	7			0
		vollkommen		2	8	20		0
	S. faecium 23 Stämme	beginnend	6	11	6			0
		vollkommen	3	3	11	6		0

Der besseren Übersicht wegen haben wir weiterhin in Tab. 5 die Hemmwerte der geprüften Antibiotica den erreichbaren Blutspiegelwerten gegenübergestellt:

Tabelle 5. *Resistenzspektrum der Enterokokken und erreichbarer Antibiotica-Blutspiegel*

	Wachstumshemmung		erreichbarer Blutspiegel
	beginnend	vollkommen	
Penicillin	0,1— 1,0 γ/ml	0,5— 10,0 γ/ml	0,6—3,5(—6) γ/ml
Streptomycin	10,0— 50,0 γ/ml	50,0— 50,0 γ/ml	7,5— 15,0 γ/ml
Chloramphenicol	0,5— 10,0 γ/ml	5,0— 50,0 γ/ml	5,0— 10,0 γ/ml
Tetracyclin	0,1— 10,0 γ/ml	1,0— 10,0 γ/ml	2,0— 5,0 γ/ml
Erythromycin	0,1— 10,0 γ/ml	0,1— 10,0 γ/ml	0,5— 10,0 γ/ml
Oleandomycin	0,5— 50,0 γ/ml	0,5— 50,0 γ/ml	10,0— 16,0 γ/ml
Selectomycin	0,5— 50,0 γ/ml	5,0— 50,0 γ/ml	2,0— 4,0 γ/ml (Galle und Muttermilch bis 80,0 γ/ml)
Polymyxin B	100,0— 100,0 γ/ml	100,0— 100,0 γ/ml	1,0— 8,0 γ/ml
Inamycin	1,0— 5,0 γ/ml	1,0— 10,0 γ/ml	10,0— 80,0 γ/ml
Kanamycin	1,0— 100,0 γ/ml	50,0— 100,0 γ/ml	8,0— 40,0 γ/ml
Viomycin	100,0— 100,0 γ/ml	100,0 γ/ml	12,0— 80,0 γ/ml
Colistin	1000,0—>1000,0E/ml	1000,0—>1000 E/ml	30,0—230,0 E/ml
Nebacetin (auf Neomycineinheiten bezogen)	1,0— 10,0 E/ml	1,0— 50,0 E/ml	Lokalantibioticum!

Diskussion

Für die von uns getesteten 113 Enterokokken-Stämme ergibt sich somit folgendes Empfindlichkeitsspektrum:

bei allen Stämmen gut wirksam:	Chloramphenicol Inamycin Nebacetin
nur bei einem Teil der Stämme gut wirksam:	Tetracyclin Erythromycin Oleandomycin
unwirksam bzw. *nur schwach wirksam:*	Penicillin Streptomycin Kanamycin Selectomycin Colistin Polymyxin B Viomycin

Die beste Wirksamkeit gegen Enterokokken haben nach unseren Ergebnissen die Antibiotica *Chloramphenicol, Inamycin* und *Nebacetin.*

Erythromycin und *Oleandomycin* sind zumeist ebenfalls gut wirksam, verschiedentlich kommen jedoch bereits resistente Stämme vor: vier unserer Stämme waren gegen Erythromycin und sechs gegen Oleandomycin unempfindlich.

Übereinstimmend mit den Angaben von Linzenmeier ist bei den Enterokokken der Anteil *Tetracyclin*-resistenter Stämme hoch: uns erwies sich nur noch die Hälfte der 113 Stämme als gut tetracyclinempfindlich.

Die Hemmwerte von *Penicillin* liegen vorwiegend bei 1,0 γ/ml und darüber*, so daß bei Anwendung dieses Antibioticums — wie bei Enterokokken-Endokarditiden — nur eine maximale Dosierung Aussicht auf Erfolg hat.

Die Resistenzwerte für *Selectomycin* überschreiten im allgemeinen die erreichbaren Blutspiegelwerte. Dank seiner starken Anreicherung in Muttermilch und Galle (bis zu 80,0 γ/ml) ist jedoch Selectomycin bei Enterokokken-Infektionen der Gallenwege und der Brustdrüse als Antibioticum der Wahl anzusehen.

Die Angaben im Schrifttum über *Streptomycin-* und *Kanamycin-*Resistenz stimmen mit unseren Ergebnissen überein. Beide Antibiotica benötigen Hemmdosen, welche die erreichbaren Blutspiegelwerte bei weitem überschreiten, und scheiden daher als Therapeutica bei Enterokokken-Affektionen aus.

Wie zu erwarten, erwiesen sich auch *Colistin* und *Polymyxin B* sowie das Tuberculostaticum *Viomycin* Enterokokken gegenüber als unwirksam.

* Auch [4,5,7,8,11,12].

Bezüglich ihrer Herkunft konnten bei unseren Stämmen keine signifikanten Resistenzabweichungen festgestellt werden. Analog den im ersten Beitrag aufgezeigten Unterschieden in der Fermentstruktur von Strept. faecalis und Strept. faecium ergab die Aufschlüsselung der getesteten 113 Stämme nach Untergruppen-Zugehörigkeit, daß Faecium-Stämme durchweg empfindlicher sind als Faecalis- und vor allem Liquefaciens-Stämme.

Zusammenfassung

Es wird ein Überblick über das in vitro-Resistenzbild von 113 eingehend serologisch und biochemisch geprüften Enterokokken-Stämmen gegeben. Chloramphenicol, Inamycin und Nebacetin waren bei allen Stämmen gut wirksam; nur ein Teil der 113 Stämme erwies sich als gut empfindlich gegen Tetracyclin, Erythromycin und Oleandomycin. Penicillin, Streptomycin, Kanamycin, Selectomycin, Colistin, Polymyxin B und Viomycin waren bei allen Stämmen entweder nicht oder nur schwach wirksam.

Den Assistentinnen Fräulein H. Ruge und Fräulein P. Rechmann sei für fleißige Mitarbeit herzlich gedankt.

Literatur

[1] Gourevitch, A., V. Z. Rossomano, T. A. Puglisi, J. M. Tynda and J. Lein: Microbiological Studies with Kanamycin. Ann. N.Y. Acad. Sci. **76**, 31 (1958).

[2] Grün, L.: Untersuchungen zur Chemotherapie der Enterokokkeninfektion. Z. Immun.-Forsch. **106**, 249 (1949).

[3] Hein, H.: Bakteriologische Untersuchungen mit Neomycin und Nebacetin. Arzneimittel-Forsch. **4**, 282 (1954).

[4] Hofmann, P., W. Biechteler, F. Meythaler, E. Hofer, L. Ritter u. R. Bedacht: Bakteriologische und klinische Ergebnisse mit Resistomycin (Kanamycin „Bayer"). Münch. med. Wschr. **101**, 1444 (1959).

[5] Klinge, K.: Enterokokken, D-Streptokokken, Streptococcus faecalis. Schweiz. Z. Path. **15**, 281 (1952).

[6] Koenig, M. G., and D. Kaye: Enterococcal Endocarditis. New Engl. J. Med. **264**, 257 (1961).

[7] Lammers, Th.: Untersuchungsergebnisse mit den Antibiotica Magnamycin und Erythromycin. Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **156**, 180 (1955).

[8] Linzenmeier, G.: Zur Antibiotica- und Sulfonamidempfindlichkeit einiger praktisch wichtiger Bakterien. Dtsch. med. Wschr. **81**, 965 (1956).

[9] Mundt, E., u. E. Barth: Diagnose und Therapie der subakuten bakteriellen Endocarditis. Med. Welt **47**, 2483 (1960).

[10] Nyman, O. H.: Studies in Enterococci. Acta path. microbiol. scand., Supp. LXXXIII. Malmö: Lundby & Lundgren 1949.

[11] Pulverer, G., u. D. Gröschel: In vitro-Untersuchungen zur Fermentausstattung von Enterokokken. Z. Hyg. Infekt-Kr. **148**, 193 (1962).

[12] Welch, H., W. W. Wright, H. I. Weinstein and A. W. Staffa: In vitro and Pharmacological Studies with Kanamycin. Ann. N.Y. Acad. Sci. **76**, 66 (1958).

Dr. G. Pulverer,
Hygiene-Institut der Universität, Köln-Lindenthal, Fürst Pückler-Straße 56

Zeitschrift f. Hygiene 148, 208—213 (1962)

Aus dem Pathologisch-Bakteriologischen Institut des Kantonsspitals Luzern
(Vorsteher: PD. Dr. M. Aufdermaur)

Harnstoff-Extrakte aus gramnegativen Bakterien in der indirekten Hämagglutinationsreaktion

II. Mitteilung

Die serologische Beziehung zwischen dem „C-Antigen" und dem Rauh-Antigen

Von
H. Brodhage

(Eingegangen am 6. November 1961)

In einer ersten Mitteilung ist über Kreuzreaktionen berichtet worden, die sich bei Verwendung von Harnstoff-vorbehandelten Bakterien (S. typhi, paratyphi-B, cholerae suis und Shig. sonnei) als sensibilisierende Antigene in der indirekten Hämagglutinationsreaktion (HAR) mit Widal-positiven Sera sowie Kaninchen-Antisera beobachten lassen. Diese Kreuzreaktionen sind nicht durch gemeinsame O- oder H-Antigene erklärbar. Es ist deshalb als Arbeitshypothese angenommen worden, daß durch die Harnstoffbehandlung der getesteten Bakterien ein diesen Bakterien gemeinsames Antigen freigelegt wird und zur Wirkung kommt, für das die Bezeichnung „C-Antigen" vorgeschlagen wurde (Brodhage). Durch die folgenden Versuche sollte nun abgeklärt werden, ob dieses „C-Antigen" mit dem R(auh)-Antigen identisch ist.

Versuchsanordnung

Die Herstellung der Harnstoff-behandelten Bakterien-Antigene (UE) der R-Formen[1] erfolgte nach der gleichen Technik wie die der S-Formen (UE/S). Sie ist in der ersten Mitteilung eingehend beschrieben. Ebenso war die Methode der indirekten HAR mit formalinisierten Hammelerythrocyten (HE) nach Weinbach sowie des Hemmtestes die gleiche. Zu bemerken ist, daß die mit den UE der R-Formen (UE/R) hergestellten sensibilisierten HE-Suspensionen bei Aufbewahrung im Kühlschrank bei +4° bereits nach wenigen Tagen eine Autoagglutination aufwiesen.

Eigene Untersuchungen

In der indirekten HAR wurde zuerst das Rauh-Serum 345 (S. minnesota) getestet. Die formalinisierten HE waren mit den verschiedenen UE/S-(„C")- bzw. UE/R-Antigenen der in der Tab. 1 genannten Bakterien sensibilisiert worden.

[1] Für die hilfreichen Diskussionen und die Überlassung der R-Formen R-1 (S. paratyphi-B), R-45 (S. cholerae suis), R-345 (S. minnesota) sowie des Rauh-Serums R-345 möchte ich auch an dieser Stelle Herrn Prof. Kauffmann, Kopenhagen, besonders herzlich danken.

Im weiteren untersuchten wir Kaninchen-Antisera, die wir durch Injektion der Tiere mit den entsprechenden UE/S(„C")-Bakterien-Antigenen gewonnen hatten (Einzelheiten siehe erste Mitteilung), sowie sechs Widal-positive Sera der Untersuchungsstation. Die HE wurden mit UE/S- und UE/R-Antigenen sensibilisiert (Tab. 2).

Schließlich überprüften wir die hemmende Wirkung der UE aus S. paratyphi-B/S (= C-Antigen) und S. paratyphi-B/R-1 mit der indirekten HAR in einem S. paratyphi-B/UE/S-Kaninchen-Antiserum (Tab. 3).

Tabelle 1. *Indirekte Hämagglutinationsreaktion mit dem Rauh-Serum 345*

Formalinisierte HE, sensibilisiert mit UE/S- bzw. UE/R-Antigenen aus	Hämagglutinationstiter des Rauh-Serum 345
S. typhi	neg.[1]
S. paratyphi-B	neg.
S. cholerae suis	neg.
Shig. sonnei	neg.
Coli O 111	neg.
R-1 (S. paratyphi-B)	1:160
R-45 (S. cholerae suis)	1: 40
R-345 (S. minnesota)	1:320

[1] Serumverdünnung im ersten Röhrchen 1:40.

Diskussion

Die in der ersten Mitteilung angeführten Beobachtungen über Kreuzreaktionen in der indirekten Hämagglutinationsreaktion (HAR) bei Verwendung von Harnstoff-behandelten Bakterienantigenen aus S. typhi, paratyphi-B, cholerae suis und Shig. sonnei zur Sensibilisierung der Hammelerythrocyten (HE) läßt vermuten, daß durch die Harnstoffbehandlung ein diesen Bakterien gemeinsames Antigen freigelegt wird und zur Wirkung kommt. Für dieses Antigen wurde die Bezeichnung „C-Antigen" (common antigen) vorgeschlagen. — Da Kreuzreaktionen bei den Rauh-Antigenen allgemein bekannt sind, erhebt sich die Frage, ob das C-Antigen mit dem R(auh)-Antigen identisch ist.

Bekanntlich sind die Antigene der Rauh-Formen nicht mehr typbestimmend (Schlosshardt) und lassen sich mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion unabhängig von der O-Gruppenzugehörigkeit bei vielen Salmonella-Bakterien nachweisen (IDE).

Die bei den S-Formen vorhandene O-antigene Spezifität geht von determinanten Gruppen, den Antigenfaktoren des Kauffmann-White-Schemas, aus (Kauffmann, Krueger u. Mitarb.). Diese sind in den spezifischen Polysaccharid-Komponenten der Endotoxin-Komplexe lokalisiert (Kauffmann, Luederitz u. Mitarb.). Während sich nun beim S → R-Wechsel die Struktur des spezifischen Polysaccharids ändert, bleiben — soweit bisher bekannt — die übrigen Komponenten im Endotoxin-Komplex, Protein und Lipoid, unverändert (Westphal). Alle R-Lipopolysaccharide enthalten die gleichen vier Zucker: Glucosamin, Heptose, Galaktose und Glucose. Sie gehören somit zum gleichen

Tabelle 2. *Die indirekte Hämagglutinationsreaktion mit Widal-positiven Sera und Kaninchen-Immunsera*

Form. HE. sensibil. mit UE/S- bzw. UE/R-Antigenen aus	Widal-positive Sera						Kaninchen-UE/S („C")-Antisera				
	2601/59	2319/60	2926/60	897/61	1487/61	2394/61	Coli-O111	S. typhi	S. paratyphi-B	S. cholerae suis	Shig. sonnei
S. typhi	320[1]	320	320	640	80	1280	1280	5120	1280	640	10240
S. paratyphi-B	320	640	640	160	1280	1280	640	5120	5120	5120	10240
S. cholerae suis	640	320	320	320	80	320	20480	neg.	80	5120	80
Shig. sonnei	320	640	320	80	640	2560	1280	5120	5120	1280	5120
Coli O 111	640	1280	640	320	320	320	10240	40	80	20	40
S. paratyphi-B/R-1	160	320	160	80	80	160	160	160	160	320	640
S. cholerae suis/R-45	320	320	80	80	80	160	160	neg.	80	80	160
S. minnesota/R-345	320	320	80	320	80	320	320	neg.	80	160	80
Widal: S. typhi	200	—	—	1600	—	50					
S. paratyphi-B	—	—	400	—	200						
S. typhimurium	—	—	800	—	100	—					
S. cholerae suis	—	—	400	—	100	—					
S. enteritidis	—	800	—	—	—	—					
Erreger-Isolierung:											
Stuhl:	—	—	—	—	+1	+2					
Blut:	—	—	—	+3	—	—					

[1] = reziproke Werte der HA-Titer; +1 = S. typhimurium; +2 = S. typhi-Dauerausscheider; +3 = S. typhi.

Chemotyp I von 16 verschiedenen Chemotypen (I—XVI), in welche die Salmonella-S-Formen auf Grund ihrer Zucker-Kombinationen eingeteilt werden können (Kauffmann, Krueger u. Mitarb.; Kauffmann, Luederitz u. Mitarb.; Luederitz u. Mitarb.; Westphal u. Mitarb.).

Da die R-Formen der S. typhi, paratyphi-B und minnesota dem Chemotyp I angehören (Kauffmann, Krueger u. Mitarb.), wäre demnach — vorausgesetzt das C-Antigen ist identisch mit dem R-Antigen — ein positiver Ausfall der HAR bei der Testung des Rauh-Serums 345 (S. minnesota) mit den UE/S(„C")-Antigenen aus S. typhi und paratyphi-B zu erwarten gewesen (Tab. 1). Das negative Versuchsergebnis mit den „C-Antigenen" im Gegensatz zur positiven Reaktion der UE/R-Antigene läßt vermuten, daß zumindest serologisch in der indirekten HAR Unterschiede zwischen den beiden Antigenen bestehen.

Tabelle 3

Hemmungstest: S. paratyphi-B/UE/S-Kaninchen-Antiserum und S. paratyphi-B/UE/S und S. paratyphi-B/UE/R-1 als Antigene

Antigenverdünnungen	Antigen S. paratyphi-B/UE/S („C-Antigen")		Antigen S. paratyphi-B/UE/R-1	
	1[1]	2	1	2
1: 2	—	—	+ + +	—
4	—	—	+ + +	—
8	—	—	+ + +	—
16	—	—	+ + +	—
32	—	—	+ + +	—
64	—	—	+ + +	—
128	+ +	—	+ + +	—
256	+ + +	+	+ + +	—
512	+ + +	+ +	+ + +	+
Serum + sensibil. HE:	+ + +	+ + +		
Serum + Antigen + norm. HE:	—			
Serum + norm. HE:	—			
sensibil. HE + HA-Puffer:	—	—		

[1] Formalinisierte HE, sensibilisiert mit 1. S. paratyphi-B/UE/S („C-Antigen") und 2. S. paratyphi-B/UE/R-1.

In den folgenden Versuchen (Tab. 2) testeten wir mit beiden Antigenarten verschiedene Widal-positive Sera der Untersuchungsstation sowie einige Kaninchen-Antisera, die wir durch Immunisierung der Tiere mit den UE/S(„C")-Antigenen erhalten hatten. In der indirekten HAR zeigen die mit den C-Antigenen sensibilisierten HE die bereits früher mitgeteilten Kreuzreaktionen. Aber auch die mit den UE/R-Antigenen sensibilisierten HE lassen Kreuzreaktionen erkennen, deren HA-Titer bei den Widal-positiven Sera durchschnittlich höher als bei den Kaninchen-Immunsera liegt. Dabei ist der Titer der UE/R-Antikörper (Hämagglutinine) in den humanen Sera bis zu vier Verdünnungsstufen niedriger als derjenige der C-Hämagglutinine. Bei den Kaninchen-Immunsera

sind die Differenzen in der Titerhöhe zum Teil noch größer (bis zu sieben Verdünnungsstufen). Aus diesen Versuchen geht hervor, daß sich mit der indirekten HAR in Widal-positiven Sera und in Kaninchen-UE/S-Antisera Hämagglutinine gegen die verwendeten UE/R-Antigene nachweisen lassen, die entsprechend der Unspezifität des R-Antigens mit relativ konstanten Titern kreuzreagieren.

Der Nachweis dieser kreuzreagierenden R-Hämagglutinine in den Sera von Patienten mit Salmonella-Infektionen läßt vermuten, daß während der Auseinandersetzung des Wirtsorganismus mit dem eindringenden Bacterium R-Antigen wirksam wird. Anscheinend wird durch körpereigene Abwehrkräfte der eindringende Erreger so verändert und aufgespalten daß auch tiefersitzende antigene Substanzen des Bacteriums, darunter das R-Antigen freigelegt werden und zur Wirkung — im Sinne der Anregung einer entsprechenden Antikörperbildung — kommen können. Es würde sich somit um den gleichen Abwehrmechanismus handeln mit dem auch das Auftreten der kreuzreagierenden „C-Antikörper" (Hämagglutinine) zu erklären versucht wurde (Brodhage).

Die beobachteten HA-Titerunterschiede — durchschnittlich deutlich höhere Titerwerte mit den UE/S(„C")-sensibilisierten HE einerseits und den mittleren, relativ konstanten Titerwerten bei den UE/R-sensibilisierten HE andererseits — weisen auf das Vorhandensein von zwei verschiedenen Hämagglutininarten hin. Diese Ansicht wird noch durch das Resultat des Hemmtestes unterstützt (Tab. 3). Hier zeigt sich in dem System bei S. paratyphi-B/UE/S-Kaninchen-Antiserum sowie S. paratyphi-B/UE/S(„C")- und S. paratyphi-B/UE/R als Antigenen ein deutlicher Unterschied in der hemmenden Wirkung beider Antigene. So vermag das UE/R-Antigen wohl die homologen R-, nicht aber die „C"-Hämagglutinine zu binden. Andererseits bindet das UE/S(„C")-Antigen beide, R- und „C"-Hämagglutinine.

Aus den durchgeführten Versuchen kann geschlossen werden, daß das UE/S-Antigen („C"-Antigen) in seiner serologischen Wirkungsweise nicht mit dem UE/R-Antigen (R-Antigen) identisch ist. Es ist aber, wie aus dem Hemmtest ersichtlich, das „C-Antigen" in der Lage, auch R-Hämagglutinine zu binden. Man muß infolgedessen annehmen, daß es sich bei dem „C-Antigen" anscheinend um einen Antigenkomplex handelt, der neben seiner spezifischen Wirkungsweise noch eine Fraktion mit R-antigener Funktion enthält. Das wäre schließlich auch die Erklärung für das Auftreten von R-Hämagglutininen in den Kaninchen-Antisera, die mit den verschiedenen UE/S(„C")-Antigenen immunisiert worden waren.

Zusammenfassung

Durch Harnstoffbehandlung von gram-negativen Bakterien (S. typhi, paratyphi-B, cholerae suis, Shig. sonnei) wird eine diesen Bakterien gemeinsame antigene Substanz, das „C-Antigen", freigelegt und kann zur Wirkung kommen. Auf Grund der durchgeführten Versuche (indirekte

HAR mit Widal-positiven Sera und Kaninchen-Immunsera sowie Hemmtest) muß angenommen werden, daß es sich bei dem „C-Antigen" vom serologischen Standpunkt aus um einen Antigenkomplex handelt. Dieser ist nicht identisch mit dem R-Antigen, enthält aber neben einer spezifischen Komponente noch weitere Fraktionen, darunter eine solche mit R-antigener Aktivität.

Literatur

Brodhage, H.: Harnstoff-Extrakte aus gramnegativen Bakterien in der indirekten Hämagglutinationsreaktion. I. Mitt. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 94–104 (1961).

Ide, M.: Kitasato Arch. exp. Med. **15**, 16 (1938); zit. nach H. Schmidt: Fortschritte der Serologie, 2. Aufl. Darmstadt: Steinkopff 1955.

Kauffmann, F., L. Krueger, O. Luederitz u. O. Westphal: Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. IV. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **182**, 57–66 (1961).

Kauffmann, F., O. Luederitz, H. Stierlin u. O. Westphal: Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. I. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **178**, 442–458 (1960).

Luederitz, O., F. Kauffmann, H. Stierlin u. O. Westphal: Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. II. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **179**, 180–186 (1960).

Schlosshardt, J.: Untersuchungen über die Entstehung von T-Antigenen im S-R-Formenwechsel bei Salmonellen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **177**, 176–185 (1960).

Westphal, O.: Récentes recherches sur la chimie et la biologie des endotoxines des bactéries à gram négatif. Ann. Inst. Pasteur **98**, 789–813 (1960).

Westphal, O., F. Kauffmann, O. Luederitz u. H. Stierlin: Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. III. Zbl. Bact., I. Abt. Orig. **179**, 336–342 (1960).

Dr. H. Brodhage,
Pathologisch-Bakteriologisches Institut, Kantonsspital Luzern, Schweiz

Zeitschrift f. Hygiene 148, 214—227 (1962)

Aus dem Institut f. klinische Bakteriologie und Serologie der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. G. B. Roemer)

Über den Einfluß frischen menschlichen Serums auf die Tetracyclinwirkung in vitro

Von
Gerd B. Roemer

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. Oktober 1961)

Die von Stamm zu Stamm wechselnde Chemosensibilität mancher Bakterienarten macht bei vielen Infektionen eine Resistenzprüfung der zugrunde liegenden Erreger zu einer unerläßlichen Voraussetzung für eine wirksame Therapie. Obwohl in der Regel eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen einer rite durchgeführten Sensibilitätsbestimmung und klinischem Erfolg zu verzeichnen ist, bieten Literatur und Praxis doch auch zahlreiche Beispiele für das Auftreten von Diskrepanzen zwischen Therapieerfolg und Laboratoriumsbefund. Die Ursachen dürften zum Teil in Unzulänglichkeiten der angewandten Technik und einer unkritischen Interpretation der in vitro erhobenen Befunde zu suchen sein. Vergleichbare Ergebnisse sind nur durch eine Standardisierung der Testmethoden zu erreichen, deren Einführung nach dem Vorgehen einiger anderer Länder auch in Deutschland dringend erwünscht wäre.

Man darf allerdings nicht übersehen, daß auch bei exakter Einhaltung genau definierter Versuchsbedingungen eine vollkommene Konkordanz zwischen den Ergebnissen in vitro und in vivo aus verschiedenen Gründen nicht zu erwarten ist. Die Bestimmung des antibakteriellen Effekts im Reagensglas gestattet lediglich eine Aussage darüber, ob der betreffende Keim unter bestimmten Versuchsbedingungen, die den Verhältnissen im lebenden Organismus nie völlig vergleichbar sind, durch die in den Körperflüssigkeiten, insbesondere im Serum, erreichbaren Antibioticumkonzentrationen bakteriostatisch, eventuell bactericid beeinflußt wird oder aber sich weiterhin zu vermehren vermag. Der unbestreitbare Wert derartiger leicht kontrollierbarer Laboratoriumsbefunde liegt in der Eliminierung der im konkreten Fall höchstwahrscheinlich unwirksamen Mittel und dem Hinweis auf die unter gleichzeitiger Berücksichtigung pharmakodynamischer und klinischer Gesichtspunkte voraussichtlich optimal wirksamen Antibiotica. Darüber hinaus lassen sich bei vorsichtiger Interpretation der festgestellten Hemmwerte Anhaltspunkte für eine erfolgversprechende Dosierung gewinnen (Naumann).

Ihre Grenzen hat die Leistungsfähigkeit der Resistenzprüfung in vitro jedoch in der Vielzahl von Imponderabilien, die in vivo in das Wechselspiel zwischen Erreger und Antibioticum eingreifen und die der

Reagensglasversuch nicht nachzuahmen gestattet. Individuell verschiedene Resorptions-, Diffusions- und Exkretionsverhältnisse sowie pathologisch-anatomische Besonderheiten können am Infektionsherd erheblich niedrigere, unter besonderen Umständen (z. B. verzögerte Ausscheidung bei gestörter Nierenfunktion) auch höhere Konzentrationen zur Folge haben als die der Resistenzprüfung zugrunde gelegten durchschnittlichen Blutspiegelwerte. Schon diese Überlegungen dürften einen Teil der gelegentlich beobachteten Therapieversager trotz mikrobiologisch erwiesener Sensibilität der Erreger, in seltenen Fällen auch Behandlungserfolge bei relativ resistenten Keimen erklären.

Es darf aber ferner nicht vergessen werden, daß zum mindesten jede Chemotherapie mit rein bakteriostatischen Mitteln der aktiven Mitarbeit des erkrankten Organismus bedarf und daß dessen natürliche Abwehrkräfte, die bei der Sensibilitätsprüfung der Erreger unberücksichtigt bleiben, die Wirkung des Antibioticums in vivo zu ergänzen und zu unterstützen vermögen und in vielen Fällen wahrscheinlich die ausschlaggebende Rolle spielen.

Von den verschiedenen Mechanismen, die bei der natürlichen Abwehr von Infektionen beteiligt sind, sind die im menschlichen Serum enthaltenen sogenannten humoralen Abwehrstoffe relativ leicht einem Studium ihrer Wirkung in vitro zugänglich. Die im folgenden beschriebenen Versuche verfolgten den Zweck, den Einfluß frisch entnommenen, nicht gepoolten Serums gesunder Personen (Blutspender) auf den antibakteriellen Effekt eines in der üblichen Dosierung rein bakteriostatisch wirksamen Antibioticums — Tetracyclin — zu ermitteln.

Während die übliche Resistenzprüfung auf die Bestimmung einer einzigen Unbekannten, nämlich der Empfindlichkeit des Erregers für das in Frage kommende Antibioticum, ausgerichtet ist, werden durch die Zugabe von menschlichem Serum weitere der Variabilität unterliegende Faktoren eingeführt, deren Auswirkung a priori schwer abzuschätzen ist. Einer etwaigen Aktivitätssteigerung steht eine entgegengesetzt wirkende teilweise Inaktivierung des Antibioticums gegenüber, die durch Bindung an das im Serum enthaltene Eiweiß zustandekommt, das außerdem als zusätzliche Nährsubstanz das Wachstum der Testbakterien zu begünstigen vermag. Auch die Möglichkeit einer Interferenz zwischen Tetracyclin und Serumbactericidie muß in Betracht gezogen werden, da Beobachtungen vorliegen, nach denen z.B. „nicht bactericide" Konzentrationen von Chloramphenicol die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber der normalen Serumbactericidie beeinträchtigen sollen (Michael und Braun).

Die Untersuchungen auf Bakteriostase wurden im Dilutionstest in peptonfreien flüssigen Nährböden mit fallenden Tetracyclinkonzentrationen durchgeführt. Die Zugabe von Serum beschränkte sich dabei auf eine konstant bleibende Menge von

Tabelle 1

Bakteriostatisch wirksame Tetracyclin-Konzentrationen in Mikrogramm/ml

Inoculum		ohne Serumzusatz	mit 10% akt. Serum	mit 10% inakt. Serum	Zahl der untersuchten Seren
Esch. coli 127	1500/ml	0,75	0,1	0,75 — 1,5	3
	1500/ml	0,75	0,2	0,75 — 1,5	3
	1500/ml	0,75	0,375	0,75 — 1,5	4
	50000/ml	3,0	1,5	3,0	5
	500000/ml	3,0	1,5	3,0	1
Esch. coli 715	5000/ml	1,5	0,2	1,5	1
	5000/ml	1,5	0,75	1,5	1
	50000/ml	3,0	0,2	3,0	3
Esch. coli 5555	50000/ml	1,5	1,5	1,5	4
Klebsiella 59	7500/ml	1,5	0,75	1,5	1
	7500/ml	1,5	1,5	1,5	4
Klebsiella 1598	50000/ml	3,0	1,5	1,5 —6,0	4
Klebsiella 8744	250000/ml	3,0	0,2	3,0	1
	250000/ml	3,0	0,75	1,5 —3,0	3
Klebsiella 8763	50000/ml	6,0	3,0	6,0	1
	50000/ml	6,0	6,0	6,0	4
Shig. flexneri	1500/ml	0,375	0,02	0,375—0,75	2
	1500/ml	0,375	0,1	0,75	2
	1500/ml	0,375	0,375	0,375	1
	25000/ml	0,75	0,2	0,75	4
Salm. paratyphi A	1500/ml	1,5	0,375	1,5	2
	1500/ml	1,5	0,75	1,5	4
	1500/ml	1,5	1,5	1,5	1
Salm. paratyphi B	1500/ml	0,75	0,375	0,75 —1,5	8
	1500/ml	0,75	0,75	0,75 —1,5	10
	7500/ml	1,5	0,75	1,5	2
	150000/ml	1,5	1,5	3,0	3
Salm. typhi	1500/ml	0,75	0,375	0,75	2
	12500/ml	0,75	0,375	1,5	2
	40000/ml	1,5	0,375	1,5 —3,0	2
Salm. braenderup	1500/ml	0,75	0,75	0,75	1
	1500/ml	0,75	1,5	1,5	1
Salm. newport	20000/ml	1,5	1,5	1,5	3
Past. pseudotuberculosis	3000/ml	0,75	0,2	0,75 —3,0	9
	200000/ml	0,75	0,375	0,75 —1,5	9
Paracholeravibrionen	75000/ml	0,375	0,1	0,375—0,75	2
	75000/ml	0,375	0,2	0,375	1
	5000000/ml	0,75	0,375	1,5	2
Staph. aureus 11234	1000/ml	0,1	0,1	0,2	2
	1000/ml	0,1	0,2	0,2	2
	100000/ml	0,2	0,375	0,375	3
Staph. aureus 6189	15000/ml	0,2	0,1	0,1	1
	15000/ml	0,2	0,2	0,2	3

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Inoculum		ohne Serumzusatz	mit 10% akt. Serum	mit 10% inakt. Serum	Zahl der untersuchten Seren
Strept. faecalis 510	2500/ml	0,375	0,375	0,375	1
Strept. faecalis 6160	30000/ml	0,75	0,375	0,375	2
	30000/ml	0,75	0,75	0,75	2
Coryneb. diphtheriae	50000/ml	0,1	0,1	0,375	1
	50000/ml	0,1	0,2	0,2	1
	250000/ml	0,1	0,1	0,1	3
Bac. cereus ATCC 8035	1000/ml	0,025	0,025	0,025—0,05	3
	1000/ml	0,025	0,05	0,05 —0,1	10

jeweils 10% des Reaktionsgemisches. Um der Eiweißwirkung des Serums Rechnung zu tragen, wurden sämtliche Seren in parallel laufenden Versuchsreihen in aktivem und inaktiviertem Zustand (nach 30 min Erhitzen auf 56° C) untersucht; Wachstumskontrollen in tetracyclinfreien Röhrchen ließen die alleinige Wirkung des Zusatzes von aktivem und inaktivem menschlichem Serum erkennen.

Von den geprüften Bakterienstämmen (16stündige Bouillonkulturen) kamen in der Regel Inocula mittlerer Größenordnung (1500—50000 Zellen/ml), teilweise auch wesentlich höhere Einsaatmengen zur Verwendung; Einzelheiten sind den Tabellen zu entnehmen. Die Bestimmung der minimalen bakteriostatisch wirksamen Tetracyclinkonzentration erfolgte in konventioneller Weise durch makroskopische Beurteilung des Freibleibens der Röhrchen von jeglicher Trübung nach 24stündiger Inkubation bei 37° C.

Von den klar gebliebenen Röhrchen wurden zur Prüfung auf etwa eingetretene Sterilität Subkulturen in flüssigen Nährmedien angelegt. Nicht zur völligen Sterilität führende Absterbevorgänge wurden durch Zählung der überlebenden subkulturfähigen Keime im Plattengußverfahren erfaßt, wobei eine eventuelle bakteriostatische Nachwirkung des Tetracyclin durch ausreichende Verdünnung ausgeschaltet wurde. In einigen Fällen erfolgte die Keimzahlbestimmung auch mit Hilfe des Membranfilterverfahrens, nachdem Vorversuche eine Übereinstimmung der beiden Methoden innerhalb einer Fehlergrenze von $\pm 5\%$ ergeben hatten.

Ein Teil der aktiven Seren zeigte noch in 10%iger Verdünnung in tetracyclinfreiem Milieu eine so stark bactericide Wirkung auf verschiedene Stämme gram-negativer Bakterienarten, daß am folgenden Tag angelegte Subkulturen steril blieben; hitzeinaktiviertes Serum der gleichen Personen ergab keinen derartigen Effekt. Als besonders empfindlich gegenüber der Serumbactericidie erwiesen sich Vibrionen und Stämme verschiedener Shigellatypen, die auch unter pathologischen Verhältnissen in vivo im zirkulierenden Blut nicht in nachweisbarer Menge aufzutreten pflegen. Die nachfolgende Darstellung berücksichtigt nur solche Seren, die für sich allein keine oder nur eine partielle Bactericidie der Teststämme erkennen ließen.

Tab. 1 zeigt die Wirkung von 150 verschiedenen menschlichen Seren auf die zur Bakteriostase erforderliche Tetracyclinkonzentration bei verschiedenen gram-negativen und gram-positiven Bakterienarten. Von

Tabelle 2. *Zahl der subkulturfähigen Keime nach 24 Std 37° C*

Stamm (Einsaatmenge)		*ohne* Tetracyclin	*mit* Tetracyclin				
			0,2	0,375	0,75	1,5	3,0 γ/ml
Klebsiella 8741	*ohne Serum*	$3{,}4 \cdot 10^9$	$6{,}4 \cdot 10^9$	$2{,}3 \cdot 10^9$	$3{,}9 \cdot 10^8$	$4{,}2 \cdot 10^4$	$1{,}0 \cdot 10^3$
(250000/ml)	Serum Mö., aktiv	$4{,}3 \cdot 10^4$	$4{,}0 \cdot 10^3$	$1{,}0 \cdot 10^3$	0	0	0
	Serum Mö., inakt.	$4{,}4 \cdot 10^9$	$8{,}3 \cdot 10^9$	$3{,}8 \cdot 10^9$	$1{,}2 \cdot 10^9$	$1{,}2 \cdot 10^5$	$2{,}0 \cdot 10^3$
	Serum Me., aktiv	$4{,}0 \cdot 10^3$	$9{,}0 \cdot 10^3$	$1{,}0 \cdot 10^4$	$7{,}7 \cdot 10^2$	0	0
	Serum Me., inakt.	$3{,}8 \cdot 10^9$	$7{,}6 \cdot 10^9$	$2{,}2 \cdot 10^9$	$1{,}1 \cdot 10^9$	$3{,}2 \cdot 10^6$	$< 1{,}0 \cdot 10^3$
	Serum Kr., aktiv	$2{,}4 \cdot 10^3$	< 10	0	0	0	0
	Serum Kr., inakt.	$2{,}6 \cdot 10^9$	$9{,}8 \cdot 10^9$	$7{,}5 \cdot 10^9$	$1{,}5 \cdot 10^9$	$3{,}8 \cdot 10^5$	$9{,}0 \cdot 10^2$
	Serum Wa., aktiv	$3{,}2 \cdot 10^4$	$1{,}1 \cdot 10^5$	$6{,}8 \cdot 10^3$	$4{,}1 \cdot 10^3$	0	0
	Serum Wa., inakt.	$3{,}3 \cdot 10^9$	$7{,}7 \cdot 10^9$	$5{,}0 \cdot 10^9$	$1{,}1 \cdot 10^9$	$2{,}2 \cdot 10^6$	$< 1{,}0 \cdot 10^3$
Klebsiella 1598	*ohne Serum*	$9{,}5 \cdot 10^8$				$2{,}8 \cdot 10^7$	$1{,}0 \cdot 10^5$
(50000/ml)	Serum St., aktiv	$7{,}2 \cdot 10^8$				$1{,}2 \cdot 10^3$	$1{,}1 \cdot 10^3$
	Serum St., inakt.	$1{,}0 \cdot 10^9$				$1{,}5 \cdot 10^7$	$2{,}1 \cdot 10^5$
	Serum F., aktiv	$5{,}3 \cdot 10^8$				$1{,}5 \cdot 10^5$	$1{,}8 \cdot 10^3$
	Serum F., inakt.	$8{,}3 \cdot 10^8$				$2{,}2 \cdot 10^7$	$1{,}6 \cdot 10^6$
Esch. coli 715	*ohne Serum*	$3{,}3 \cdot 10^8$			$2{,}2 \cdot 10^8$	$1{,}1 \cdot 10^7$	$3{,}0 \cdot 10^3$
(30000/ml)	Serum Ol., aktiv	$3{,}5 \cdot 10^5$			$8{,}4 \cdot 10^3$	0	0
	Serum Ol., inakt.	$2{,}7 \cdot 10^8$			$2{,}7 \cdot 10^8$	$2{,}2 \cdot 10^7$	$1{,}6 \cdot 10^3$
	Serum St., aktiv	$3{,}9 \cdot 10^5$			$2{,}1 \cdot 10^4$	$7{,}0 \cdot 10^2$	0
	Serum St., inakt.	$2{,}9 \cdot 10^8$			$1{,}5 \cdot 10^8$	$1{,}0 \cdot 10^6$	$0{,}8 \cdot 10^3$
Esch. coli 127	*ohne Serum*	$3{,}5 \cdot 10^8$			$1{,}2 \cdot 10^8$	$5{,}4 \cdot 10^6$	$1{,}6 \cdot 10^4$
(50000/ml)	Serum Sa., aktiv	$5{,}2 \cdot 10^8$			$2{,}0 \cdot 10^8$	$2{,}5 \cdot 10^2$	$2{,}8 \cdot 10^2$
	Serum Sa., inakt.	$5{,}3 \cdot 10^8$			$1{,}2 \cdot 10^8$	$4{,}9 \cdot 10^5$	$1{,}3 \cdot 10^4$
	Serum Pe., aktiv	$4{,}2 \cdot 10^8$				$7{,}0 \cdot 10^2$	9
	Serum Pe., inakt.	$6{,}8 \cdot 10^8$				$3{,}6 \cdot 10^5$	$6{,}0 \cdot 10^3$
Esch. coli 5555	*ohne Serum*	$1{,}7 \cdot 10^8$			$7{,}0 \cdot 10^7$	$1{,}1 \cdot 10^4$	$5{,}7 \cdot 10^3$
(50000/ml)	Serum Ro., aktiv	$1{,}4 \cdot 10^8$			$3{,}5 \cdot 10^7$	$1{,}0 \cdot 10^3$	$1{,}7 \cdot 10^3$
	Serum Ro., inakt.	$2{,}7 \cdot 10^8$			$1{,}0 \cdot 10^8$	$< 1{,}0 \cdot 10^4$	$3{,}3 \cdot 10^3$
	Serum Wo., aktiv	$1{,}4 \cdot 10^8$			$6{,}0 \cdot 10^7$	$2{,}4 \cdot 10^4$	$4{,}1 \cdot 10^3$
	Serum Wo., inakt.	$2{,}5 \cdot 10^8$			$7{,}0 \cdot 10^7$	$2{,}0 \cdot 10^5$	$4{,}3 \cdot 10^3$

Shig. Flexneri 300 (25000/ml)	*ohne Serum*		$1{,}2 \cdot 10^8$	$3{,}1 \cdot 10^7$	$1{,}6 \cdot 10^7$	$9{,}6 \cdot 10^3$	$3{,}7 \cdot 10^3$	
	Serum Op.,	aktiv	$9{,}2 \cdot 10^7$	30	0	0	0	
	Serum Op.,	inakt.	$1{,}0 \cdot 10^8$	$2{,}9 \cdot 10^7$	$8{,}1 \cdot 10^6$	$1{,}3 \cdot 10^3$	$< 1{,}0 \cdot 10^3$	
	Serum Ba.,	aktiv	$7{,}6 \cdot 10^7$	$1{,}1 \cdot 10^4$	$4{,}3 \cdot 10^3$	14	0	
	Serum Ba.,	inakt.	$9{,}8 \cdot 10^7$	$5{,}0 \cdot 10^7$	$1{,}1 \cdot 10^7$	$6{,}4 \cdot 10^3$	$5{,}0 \cdot 10^3$	
	Serum Gr.,	aktiv	$6{,}5 \cdot 10^4$	10	21	0	0	
	Serum Gr.,	inakt.	$7{,}6 \cdot 10^7$	$4{,}9 \cdot 10^7$	$3{,}8 \cdot 10^4$	$1{,}3 \cdot 10^3$	$7{,}6 \cdot 10^2$	
	Serum Si.,	aktiv	$7{,}4 \cdot 10^7$	$8{,}6 \cdot 10^4$	2	0	0	
	Serum Si.,	inakt.	$1{,}7 \cdot 10^8$	$6{,}1 \cdot 10^7$	$3{,}2 \cdot 10^7$	$1{,}2 \cdot 10^3$	$9{,}3 \cdot 10^2$	
Salm. typhi 1691 (35000/ml)	*ohne Serum*		$9{,}5 \cdot 10^7$		$8{,}3 \cdot 10^7$	$2{,}5 \cdot 10^6$	$6{,}2 \cdot 10^3$	$8{,}2 \cdot 10^3$
	Serum Ei.,	aktiv	$4{,}0 \cdot 10^6$		$3{,}6 \cdot 10^3$	$6{,}5 \cdot 10^2$	$1{,}8 \cdot 10^2$	1
	Serum Ei.,	inakt.	$1{,}5 \cdot 10^8$		$5{,}2 \cdot 10^7$	$4{,}3 \cdot 10^6$	$2{,}4 \cdot 10^6$	$2{,}0 \cdot 10^6$
	Serum Al.,	aktiv	$4{,}1 \cdot 10^5$		0	9	0	0
	Serum Al.,	inakt.	$1{,}3 \cdot 10^8$		$5{,}5 \cdot 10^7$	$2{,}5 \cdot 10^6$	$2{,}0 \cdot 10^3$	$1{,}3 \cdot 10^3$
Salm. typhi 1692 (15000/ml)	*ohne Serum*		$1{,}1 \cdot 10^8$		$2{,}1 \cdot 10^7$	$2{,}6 \cdot 10^5$	$5{,}0 \cdot 10^3$	$6{,}0 \cdot 10^3$
	Serum St.,	aktiv	$3{,}5 \cdot 10^6$		$4{,}2 \cdot 10^5$	$1{,}2 \cdot 10^4$	$1{,}1 \cdot 10^2$	11
	Serum St.,	inakt.	$1{,}5 \cdot 10^8$		$8{,}0 \cdot 10^7$	$5{,}1 \cdot 10^7$	$5{,}6 \cdot 10^5$	$2{,}0 \cdot 10^3$
	Serum Sch.,	aktiv	$5{,}2 \cdot 10^5$			$8{,}9 \cdot 10^3$	$1{,}7 \cdot 10^2$	2
	Serum Sch.,	inakt.	$8{,}0 \cdot 10^7$		$7{,}6 \cdot 10^7$	$3{,}3 \cdot 10^7$	$1{,}4 \cdot 10^5$	$3{,}0 \cdot 10^3$
Past. pseudo-tuberculosis 21 (200000/ml)	*ohne Serum*		$1{,}6 \cdot 10^8$		$1{,}9 \cdot 10^8$		$1{,}7 \cdot 10^3$	
	Serum Br.,	aktiv	$1{,}5 \cdot 10^8$		$1{,}5 \cdot 10^6$		2	
	Serum Br.,	inakt.	$1{,}9 \cdot 10^8$		$2{,}0 \cdot 10^8$		$2{,}7 \cdot 10^3$	
	Serum Bg.,	aktiv	$1{,}9 \cdot 10^8$		$5{,}4 \cdot 10^4$		13	
	Serum Bg.,	inakt.	$2{,}0 \cdot 10^8$		$1{,}2 \cdot 10^8$		$3{,}2 \cdot 10^3$	
	Serum Bs.,	aktiv	$0{,}6 \cdot 10^8$		$8{,}7 \cdot 10^5$		3	
	Serum Bs.,	inakt.	$1{,}3 \cdot 10^8$		$1{,}5 \cdot 10^8$		$1{,}8 \cdot 10^3$	
	Serum Me.,	aktiv	$0{,}7 \cdot 10^8$		$9{,}1 \cdot 10^5$		4	
	Serum Me.,	inakt.	$1{,}3 \cdot 10^8$		$2{,}9 \cdot 10^8$		$3{,}2 \cdot 10^3$	

wenigen, praktisch kaum ins Gewicht fallenden Ausnahmen abgesehen, hatte der Zusatz inaktivierten Serums erwartungsgemäß keine Wirkungssteigerung des Tetracyclin zur Folge; die bakteriostatischen Grenztiter waren entweder die gleichen wie in der Standardreihe (ohne Serum) oder lagen 1—2 Stufen höher. Dagegen ergaben die Reihen mit Zusatz von aktivem Serum ein völlig anderes Bild. Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, variierten die Ergebnisse sehr stark je nach Stamm, Einsaatmenge und individuell verschiedenen Eigenschaften der zugesetzten Seren. Während zum Beispiel bei dem Colistamm 5555 die bei 1,5 γ/ml liegende Hemmdosis durch keines der vier geprüften Seren eine Änderung erfuhr, bewirkte bei den Stämmen Esch. coli 127 und 715 der Zusatz von 10% aktivem Serum in 21 Fällen ausnahmslos eine Erniedrigung des bakteriostatischen Grenzwerts um eine oder mehrere, maximal vier Stufen (Zweierpotenzen). Ähnliche Abhängigkeiten von Stammes- und Serumeigenschaften wurden bei der Prüfung vier verschiedener Klebsiellastämme beobachtet. Besonders deutlich wurde die Erniedrigung der bakteriostatisch wirksamen Tetracyclindosis durch die Kombination mit aktivem Serum ferner bei Shig. flexneri, Pasteurella pseudotuberculosis und Vibrionen. Von den geprüften Salmonellatypen erwiesen sich Stämme der Gruppe C (Salm. braenderup, Salm. newport) als refraktär, während Stämme der Gruppen A, B und D (Salm. paratyphi A und B, Salm. typhi) bei mittelgroßen Einsaatmengen in der Mehrzahl der Fälle durch Konzentrationen gehemmt wurden, die ein bis zwei Stufen unter dem Grenzwert der Standardreihe lagen.

Die geprüften gram-positiven Bakterien, zu denen auch der häufig zu Blutspiegelbestimmungen benutzte Bacillus cereus ATCC 8035 gehörte, ließen sämtlich das Phänomen einer gesteigerten Empfindlichkeit für Tetracyclin durch Zusatz von Aktivserum vermissen. In drei Fällen, in denen der Hemmwert in der Reihe mit aktivem Serum eine Stufe niedriger lag als in der Standardreihe, wurde der gleiche Effekt durch inaktiviertes Serum erzielt; es könnte sich dabei um die Wirkung eines relativ thermostabilen, bei der Bakteriostase der gram-negativen Bakterien nicht in Erscheinung tretenden Serumfaktors handeln.

Genaueren Aufschluß über das Verhalten der Testbakterien unter den angegebenen Versuchsbedingungen vermittelten die nach verschiedenen Einwirkungszeiten vorgenommenen Keimzählungen.

Tab. 2 enthält einige Angaben über die Anzahl der nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C überlebenden Keime in tetracyclinfreien und tetracyclinhaltigen Nährböden unterschiedlicher Konzentration mit und ohne Zusatz von aktivem bzw. hitzeinaktiviertem Serum.

In tetracyclinfreiem Milieu war die Wirkung des Zusatzes von 10% aktivem Serum zu diesem Zeitpunkt nur in einem Teil der Fälle durch eine im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen geringere Keimzahl

erkennbar, die meistens in einer der Einsaatmenge entsprechenden Größenordnung lag, selten niedriger. In Kulturen mit inaktivem Serum waren die 24 Std-Werte den Keimzahlen in serumfreiem Medium vergleichbar.

In den Versuchsreihen mit Tetracyclin und inaktiviertem Serum war bei Berücksichtigung der in wachstumsgehemmten Kulturen spontan

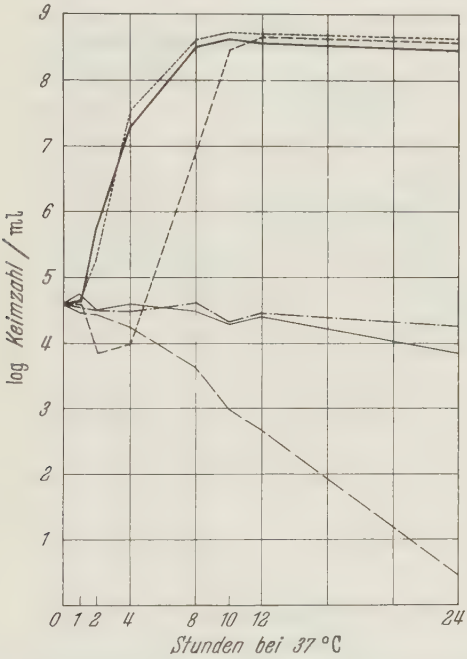


Abb. 1. Wirkung einer Tetracyclinkonzentration von 3,0 γ/ml auf Esch. coli 127 in serumfreier Bouillon und in Kombination mit aktivem und mit inaktiviertem menschlichem Serum. (Einsaatmenge 45000/ml; Serum Pe.)
Keimzahl in Bouillon:
ohne Serum: ——————
mit 10% aktivem Serum: - - - - -
mit 10% inaktivem Serum: .....
mit 3,0 γ/ml Tetracyclin ohne Serum: —·—·—
mit 3,0 γ/ml Tetracyclin und 10% aktivem Serum: — — —
mit 3,0 γ/ml Tetracyclin und 10% inaktivem Serum: ——

eintretenden Absterbevorgänge bei Konzentrationen bis 3,0 γ/ml ein lediglich bakteriostatischer Effekt zu verzeichnen. Dagegen bewirkten die gleichen Tetracyclinkonzentrationen in Kombination mit aktiven Seren bei einem großen Teil der gram-negativen Stämme entweder eine völlige Sterilisierung oder eine Dezimierung der Population bis auf einige wenige „persisters“ (ein- bis zweistellige Zahlen). Auch solche Seren, die in 10%iger Verdünnung ohne Tetracyclin keinerlei Wirkung erkennen ließen, vermochten in Kombination mit sonst nur bakterio-

statisch wirksamen Konzentrationen dieses Antibioticums eine Bactericidie herbeizuführen.

Die Ergebnisse einmaliger Stichproben nach 24stündiger Inkubation ergeben insofern ein unvollkommenes Bild, als sie eine nur vorübergehende Keimreduktion nicht erfassen und die Tatsache unberücksichtigt lassen, daß Tetracyclin bei höherer Temperatur eine allmähliche

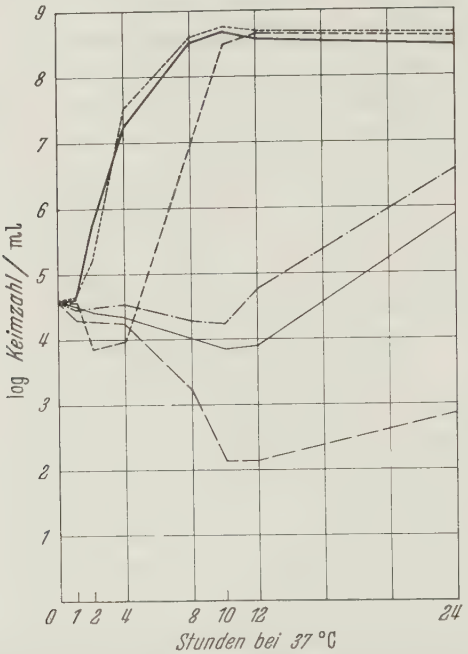


Abb. 2. Wirkung einer Tetracyclinkonzentration von 1,5 γ/ml auf Esch. coli 127 in serumfreier Bouillon und in Kombination mit aktivem und mit inaktiviertem menschlichem Serum. (Einsaatmenge 45000/ml; Serum Pe.)
Keimzahl in Bouillon:

ohne Serum: ——————
mit 10% aktivem Serum: — — — —
mit 10% inakt. Serum: .....
mit 1,5 γ/ml Tetracyclin ohne Serum: — · — · —
mit 1,5 γ/ml Tetracyclin und 10% aktivem Serum: — — —
mit 1,5 γ/ml Tetracyclin und 10% inakt. Serum: ——————

Wirkungseinbuße erfährt, die innerhalb 24 Std ein beträchtliches Ausmaß erreichen kann (bei 37°C und p_H 7,0 ca. 50%). Es ist deshalb damit zu rechnen, daß in manchen Fällen nach einem anfänglichen starken Keimabfall ein Wiederanstieg einsetzt, sobald die noch bakteriostatisch wirksame Tetracyclinmenge unterschritten wird. Die Ergebnisse fortlaufender Keimzählungen (nach 1, 2, 4, 8, 10, 12 und 24 Std) bestätigten diese Erwartung; einige Beispiele sind in den Abb. 1—5 in Form von Kurven dargestellt.

Die Abb. 1 und 2 zeigen das Verhalten eines Colistamms in den parallel laufenden Versuchsreihen bei Tetracyclinkonzentrationen von 1,5 und 3,0 γ/ml. Der Einfluß aktiven Serums in tetracyclinfreier Bouillon äußerte sich hier in einer initialen Keimverminderung innerhalb der ersten beiden Stunden, der ein zunächst verzögert einsetzender, nach 4 Std aber den beiden Kontrollreihen annähernd parallel verlaufender

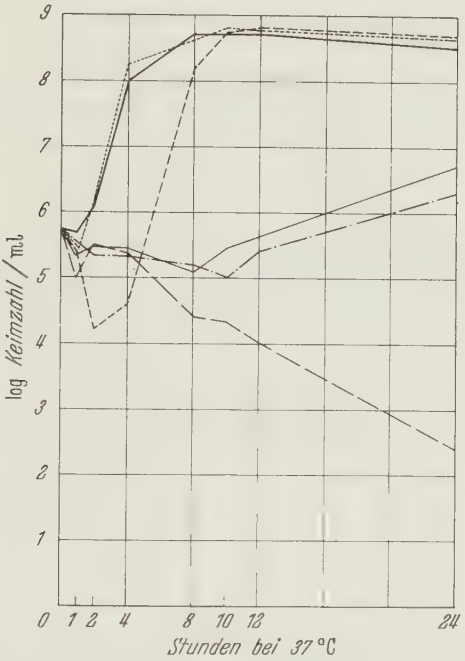


Abb. 3. Wirkung einer Tetracyclinkonzentration von 1,5 γ/ml auf Esch. coli 127 in serumfreier Bouillon und in Kombination mit aktivem und mit inaktiviertem menschlichem Serum. (Einsaatmenge 550000/ml; Serum Sr.)
Keimzahl in Bouillon:
ohne Serum: ———
mit 10% aktivem Serum: — — — —
mit 10% inakt. Serum: ·····
mit 1,5 γ/ml Tetracyclin ohne Serum: —·—·—
mit 1,5 γ/ml Tetracyclin und 10% aktivem Serum: — — —
mit 1,5 γ/ml Tetracyclin und 10% inakt. Serum: ———

steiler Anstieg der Bakterienzahl folgte; nach 10 Std war in allen tetracyclinfreien Röhrchen ein stationäres Stadium mit annähernd gleicher Keimdichte erreicht.

In der Anfangskonzentration von 3,0 γ/ml bewirkte Tetracyclin allein eine bloße Hemmung der Keimvermehrung, während bei Kombination mit aktivem Serum ein kontinuierliches Absterben der Bakterienpopulation bis auf drei überlebende Keime erfolgte. Dagegen ergab sich bei der geringeren Tetracyclinkonzentration von 1,5 γ/ml nach Ablauf

von 10 Std ein Knick der Verlaufskurven, der zu einem deutlichen, mit Aktivserum allerdings weniger steil verlaufenden Anstieg der Keimzahlen führte.

Daß bei diesen Reaktionen Besonderheiten des Serums eine Rolle spielen, demonstriert die Abb. 3. Die mit dem gleichen Stamm, aber einem anderen Serum und höherer Einsaatmenge unter sonst gleichen

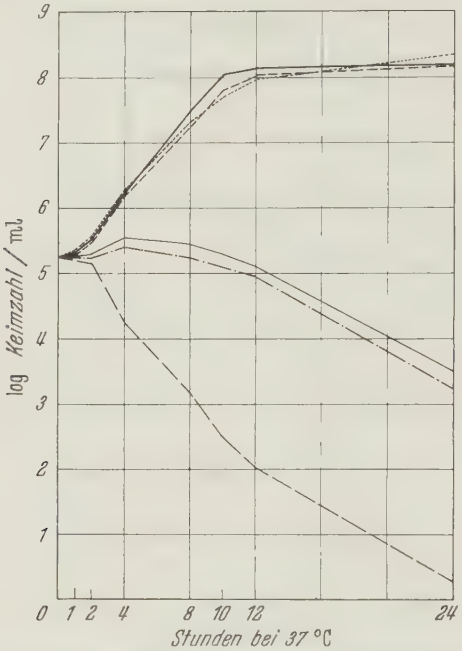


Abb. 4. Wirkung einer Tetracyclinkonzentration von 1,5 γ/ml auf Pasteurella pseudotuberculosis 21 in serumfreier Bouillon und in Kombination mit aktivem und mit inaktiviertem menschlichem Serum. (Einsaatmenge 200000/ml; Serum Br.)
Keimzahl in Bouillon:

ohne Serum:	———
mit 10% aktivem Serum:	— — —
mit 10% inakt. Serum:	·····
mit 1,5 γ/ml Tetracyclin ohne Serum:	—·—
mit 1,5 γ/ml Tetracyclin und 10% aktivem Serum:	— — —
mit 1,5 γ/ml Tetracyclin und 10% inakt. Serum:	———

Bedingungen durchgeführten Versuche ergaben bei 1,5 γ/ml Tetracyclin in Nährmedien ohne Serum und mit Zusatz inaktivierten Serums nach anfänglicher Bakteriostase eine nach 8 bzw. 10 Std einsetzende langsame Vermehrung, während sich der Absterbeprozeß in der Kombination mit aktivem Serum auch in den folgenden Stunden fortsetzte. — Die durch frisches Serum allein zustandekommende initiale Bactericidie war bei diesen Versuchen in tetracyclinhaltiger Bouillon schwächer ausgeprägt.

Die Abb. 4 und 5 zeigen Verlaufskurven bei einem Stamm von Pasteurella pseudotuberculosis unter Verwendung eines Serums, das für sich allein gegenüber diesem Stamm keine in vitro erfaßbare Bactericidie erkennen ließ; zusammen mit einer Tetracyclindosis von 1,5 γ/ml bewirkte es jedoch eine nach 2 Std verstärkt einsetzende Reduktion der Keimzahl von 200000 auf zwei überlebende Zellen je Milliliter. Bei einer

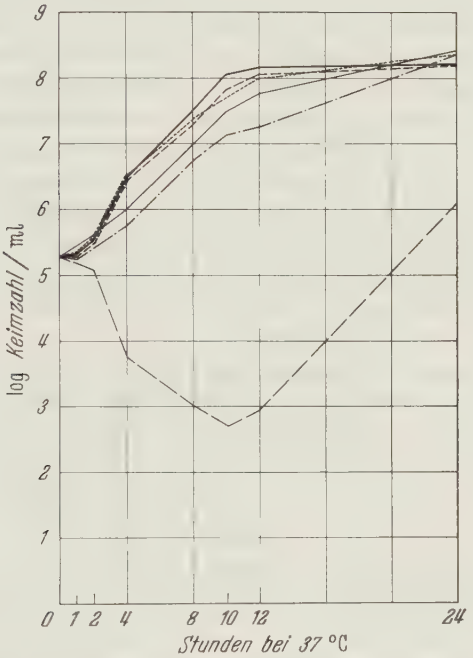


Abb. 5. Wirkung einer Tetracyclinkonzentration von 0,375 γ/ml auf Pasteurella pseudotuberculosis 21 in serumfreier Bouillon und in Kombination mit aktivem und mit inaktiviertem menschlichem Serum. (Einsaatmenge 200000/ml; Serum Br.)
Keimzahl in Bouillon:
ohne Serum: ——————
mit 10% aktivem Serum: — — — —
mit 10% inakt. Serum: .....
mit 0,375 γ/ml Tetracyclin ohne Serum: —·—·—
mit 0,375 γ/ml Tetracyclin und 10% aktivem Serum: — — —
mit 0,375 γ/ml Tetracyclin und 10% inakt. Serum: ——————

Anfangskonzentration von nur 0,375 γ/ml war nach 10stündiger Bebrütung der Grenzwert der in dieser Kombination noch wirksamen Tetracyclinkonzentration erreicht, so daß innerhalb der nächsten 14 Std eine Vermehrung um mehrere Zehnerpotenzen vor sich gehen konnte.

Die hier dargestellten Ergebnisse weisen daraufhin, daß durch das Zusammentreffen von Tetracyclin mit einem im frischen Serum gesunder Personen vorkommenden Faktor ein synergistischer Effekt zustandekommen kann, der bei manchen gram-negativen Bakterien nicht nur

eine Verstärkung der bakteriostatischen Tetracyclinwirkung zur Folge hat, sondern darüber hinaus häufig mit einer durch keine der beiden Komponenten allein erreichbaren, nicht selten bis zur völligen Sterilität fortschreitenden Bactericidie verbunden ist. Dieser über eine bloße additive Wirkung hinausgehende Effekt ist offensichtlich abhängig von Stammeseigentümlichkeiten der Bakterien und von den individuell verschiedenen Eigenschaften der geprüften Seren. Auch frühere, von E. MANNWEILER an Salmonellen durchgeführte Untersuchungen, die bei Prüfung in einer peptonhaltigen 20%igen Blutbouillon eine bactericide Tetracyclinwirkung erkennen ließen, sprechen mit großer Wahrscheinlichkeit für eine Aktivitätssteigerung durch humorale Abwehrstoffe.

Welcher Natur der im aktiven Serum wirksame Faktor ist, kann aus den bisherigen Ergebnissen nicht mit Sicherheit gefolgert werden. Bekanntlich stellt die Serumbactericidie einen sehr komplexen Vorgang dar, an dem mehrere teils thermolabile, teils thermostabile Komponenten beteiligt zu sein scheinen. Einige unserer Untersuchungen lassen Beziehungen zum Properdinsystem vermuten. Der in Kombination mit Tetracyclin wirksam werdende Serumfaktor wurde bereits durch 30 min langes Erhitzen auf 52° C inaktiviert und ließ sich durch Bindung an Zymosan bei 37° und bei 17° C entfernen. Seine Wirksamkeit beschränkte sich wie beim Properdin auf gram-negative Bakterien, deren Empfänglichkeit nicht an Art-, sondern Stammeseigenschaften gebunden war. Sichere Beziehungen zum Gehalt des Serums an spezifischen Antikörpern ließen sich nicht nachweisen.

Anhaltspunkte für eine etwaige Interferenz zwischen Serumbactericidie und Tetracyclinwirkung ergaben sich nur ausnahmsweise bei einigen Seren mit sehr stark bactericider Wirkung und dafür hochempfindlichen Keimen (Shigellen, Vibrionen). Hier führten gelegentlich minimale Tetracyclinkonzentrationen (0,01—0,05 γ/ml) zu einer Beeinträchtigung der bactericiden Serumwirkung, während etwas höhere Konzentrationen zusammen mit aktivem Serum sterilisierend wirkten.

Obwohl die unseren Untersuchungen zugrunde gelegte einfache Versuchsanordnung weit davon entfernt ist, ein Spiegelbild der in vivo maßgeblichen Verhältnisse darzustellen, scheinen uns die dabei erhobenen Befunde doch ein gutes Beispiel dafür zu liefern, daß die mit den üblichen Standardmethoden festgestellte Wirksamkeit eines Antibioticums durch das Hinzutreten eines im Kräftespiel zwischen Erreger und Wirtsorganismus wirksamen Faktors in einem von Fall zu Fall wechselnden Ausmaß positiv beeinflußt werden kann.

Zusammenfassung

Ausgehend von der Überlegung, daß die natürlichen Abwehrkräfte des menschlichen Organismus eine notwendige Ergänzung der antibiotischen Therapie bakterieller Infektionen darstellen, behandelt die

vorliegende Mitteilung den Einfluß frischen menschlichen Serums auf die antibakterielle Wirksamkeit therapeutisch erreichbarer Tetracyclinkonzentrationen in vitro. Durch die synergistische Wirkung eines im Serum gesunder Personen vorhandenen Faktors wurde bei gramnegativen Bakterien nicht nur eine Verstärkung der bakteriostatischen Tetracyclinwirkung erzielt, sondern darüber hinaus in manchen Fällen eine durch keine der beiden Komponenten allein erreichbare Bactericidie. Das Ausmaß dieses Effektes ist abhängig von Stammeseigenschaften der Erreger und den individuell verschiedenen Eigenschaften menschlicher Seren. Einige Feststellungen deuten darauf hin, daß eine dem Properdin ähnliche Komponente des Serums am Zustandekommen der beschriebenen Wirkungen beteiligt ist.

Fräulein Elisabeth Baltzersen bin ich für sorgfältige und unermüdliche Assistenz, dem Blutspendedienst der Chirurgischen Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (Leiter Dr. med. H. Busch) für die freundliche Unterstützung durch Bereitstellung von Spenderblutproben, der Firma Farbenfabriken Bayer für die Überlassung von Testsubstanz sehr zu Dank verpflichtet.

Literatur

Klein, P.: Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1957.

Mannweiler, E.: Z. Immun.-Forsch. **115**, 38 (1958).

Michael, J. G., and W. Braun: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **102**, 486 (1959).

Naumann, P.: Antibiotica-Blutspiegel und Resistenzbestimmung. Antibiotica et Chemotherapia, Vol. 10 (im Druck).

Schmidt, H.: Das Properdin. Darmstadt: Steinkopff 1959.

Professor Dr. Dr. G. B. Roemer,
Institut für klinische Bakteriologie und Serologie der Universität,
Hamburg-Eppendorf, Universitätskrankenhaus

Zeitschrift f. Hygiene 148, 228—229 (1962)

Aus der Medizinaluntersuchungsanstalt (Leiter: Prof. Dr. S. Winkle) und der Untersuchungsanstalt für Städtehygiene (Leiter: Prof. Dr. Dr. H.-O. Hettche) am Hygienischen Institut der Freien und Hansestadt Hamburg

S.makumira = 4,12: e, n, x: 1,7, eine neue Salmonella-species aus einer afrikanischen Vogelkotprobe

Von

R. Rohde und G. Müller

(Eingegangen am 20. November 1961)

Anfang September 1961 erhielten wir aus Tanganyika eine etwa linsengroße Taubenkotprobe zur bakteriologischen Untersuchung auf Salmonellen. Aus der in völlig vertrocknetem Zustand eingetroffenen Probe gelang nach Anreicherung in Kristallviolett-Bouillon und anschließender Aussaat auf Phenolrot-Agar die Isolierung von zwei Salmonellaspecies, deren endgültige Typisierung in unserer Salmonella-Zentrale erfolgte.

Die Tatsache, daß aus der einzigen Faecesprobe einer Taube zwei verschiedene *Salmonella*-Arten gezüchtet werden konnten, spricht für einen hohen Durchseuchungsgrad der afrikanischen Vogelwelt; dieser ist zweifellos auch von großem epidemiologischen Interesse, denn durch Vögel kann leicht eine sekundäre Infektion vieler afrikanischer Handelsgüter verursacht werden. Der hochgradige Salmonellabefall afrikanischer Fischmehle läßt sich ohne weiteres durch die Verschmutzung mit salmonellahaltigem Vogelkot erklären, da es bekannt ist, daß die Vögel die Fischmehllagerstätten scharenweise als Futterplätze aufsuchen und dabei verunreinigen.

Von den isolierten *Salmonella-species* erwies sich eine als Keim der C_2-Gruppe und konnte nach genauer Antigen-Analyse als *S. muenchen var. oregon* identifiziert werden. Bei der zweiten species (Nr. 820—61) handelte es sich um einen Vertreter der B-Gruppe mit einer neuen Antigenkombination. Dieser gramnegative, gut bewegliche Keim hatte folgende biochemische Eigenschaften:

Keine Indolbildung, keine Harnstoffspaltung, kein Wachstum im KCN-Substrat, Verflüssigung der *Kohn-Lautrop*-Gelatine mit und ohne Toluolzusatz nach zwei Tagen, reichliche Bildung von Schwefelwasserstoff, Reduktion von Nitrat zu Nitrit, negative *Voges-Proskauer*- und positive Methylrot-Reaktion. Prompte Säurebildung aus Dextrose (gleichzeitig Gasbildung), Arabinose, Dulcit, Rhamnose, Trehalose, Xylose, Mannit (Gasbildung), Maltose und Sorbit. Lilafärbung von *Sterns* Glycerin-Fuchsin-Bouillon nach 24 Std. Keine Spaltung von Lactose, Saccharose, Adonit, Salicin sowie Inosit nach dreiwöchiger Beobachtungszeit. Die d-Tartrat-Reaktion, geprüft mit verschiedenen Einzelkolonien, erfolgte unregelmäßig und verzögert und sollte infolgedessen als *x* bezeichnet werden. l- und

i-Tartrat wurden innerhalb von 14 Tagen nicht angegriffen. Citrat und Malonat wurden nach zwei Tagen gespalten, Mukat nach einem Tag. Das Verhalten dieses Keimes in den organischen Säuren, insbesondere in d-Tartrat, Citrat, Mukat und Malonat, sowie die Verflüssigung von Gelatine weisen auf die Zugehörigkeit zu *Salmonella sub-genus II* hin, so daß er biochemisch eine Stellung zwischen den typischen Salmonellen (*sub-genus I*) und den Arizonakulturen einnimmt[1,2].

Serologisch konnte die Antigenformel 4,12 : e,n,x : 1,7 ermittelt werden. Das O-Antigen agglutinierte in einem O-Serum 4,12 von S. essen sowie in einem absorbierten Serum O 4. Die Objektglas-Agglutinationen in den absorbierten Seren O 5 bzw. O 27 waren negativ. Ein O 1 Antigen, das häufig einem Formenwechsel unterliegt, konnte auch bei Prüfung von 20 Einzelkolonien nicht nachgewiesen werden.

Die erste H-Phase agglutinierte in Anti-Seren H e, h—e, n, x und e,n,z_{15}. Bei Prüfung mit Faktorseren waren die Agglutinationen in H h- und H z_{15}-Seren negativ, in den absorbierten Seren H n—H x und H z_{16} positiv. Die Reaktion in einem H *x*-Serum von *S. chester* (ohne z_{16}-Receptoren) war dagegen negativ, wie das häufig bei Vertretern mit einer e,n,x-Phase von *sub-genus II* (z. B. *S. dar-es-salaam* = 1,9,12 : l,w : e,n,x) zu beobachten ist.

Die zweite H-Phase agglutinierte in den verschiedenen unspezifischen Anti-Seren H 1,2 — 1,5 — 1,6 — 1,7 usw. und außerdem in einem absorbierten H-Serum 7. Die Reaktionen mit den Faktor-Seren H 2, H 5, H 6 und H z_6 waren negativ.

Somit ergab sich die obige Antigenformel 4,12 : e,n,x : 1,7. Da diese Antigenformel bisher unbekannt war, mußte es sich um eine neue *Salmonella-species* handeln, die nach ihrem afrikanischen Fundort die Bezeichnung *S. makumira* erhielt.

Zusammenfassung

Aus einer afrikanischen Vogelkotprobe (Taube) konnte eine neue *Salmonella-species* mit der Antigenformel 4,12 : e,n,x : 1,7 isoliert werden. Auf Grund ihrer biochemischen Eigenschaften gehört diese neue *species* zu *Salmonella sub-genus II*. Es wird auf den hohen Durchseuchungsgrad der afrikanischen Vogelwelt und die damit verbundene Gefahr einer Kontamination der aus diesem Erdteil stammenden Handelsgüter (wie z. B. Fischmehl) hingewiesen.

Für die liebenswürdige Nachprüfung und Bestätigung unserer Befunde danken wir vielmals Herrn Prof. Kauffmann, Leiter der Internationalen Salmonella-Zentrale in Kopenhagen.

Literatur

[1] Kauffmann, F.: Two biochemical sub-divisions of the genus Salmonella. Acta path. microbiol. scand. **49**, 393 (1960).

[2] Kauffmann, F.: Die Bakteriologie der Salmonella-species. Kopenhagen: Munksgaard 1961.

Dr. R. Rohde und Dr. G. Müller, Hamburg 36, Gorch Fock-Wall 15/17

Zeitschrift f. Hygiene 148, 230—240 (1962)

Aus der Impfanstalt Hamburg (Leiter Dr. W. Ehrengut)

Über Persistenz des Vaccine-Virus nach der Pockenschutzimpfung. Zugleich ein Beitrag zur Frage der vaccinalen Immunität

Von

W. Ehrengut

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 4. Dezember 1961)

Die Frage, welche Faktoren bei der Überwindung einer Virusinfektion im Spiele sind, ist von großem praktischem Interesse, und es ist lohnend, sich ab und zu nach dem neueren Stand unserer Kenntnisse zu orientieren. Schon seit Jenner weiß man, daß die Infektion des Menschen mit dem Vaccinevirus eine Immunität gegenüber dem Variola-Erreger schafft, die — wenn sie auch beim einzelnen Individuum von unterschiedlicher Dauer ist — im allgemeinen nach Jahren bemessen werden darf.

Bald erkannte man die Tatsache, daß im Organismus Gewebe unterschiedlicher Vaccineempfänglichkeit existieren. Es sei nur an die Empfänglichkeit der Cornea für diese Virusinfektion trotz vorhandener Vaccineimmunität der übrigen Gewebe erinnert. Die mangelhafte Durchblutung der Hornhaut macht es teilweise verständlich, daß das Vaccinevirus leichter haften kann. Daß aber hierfür die humorale Immunität allein nicht maßgeblich sein kann, wird durch neuere immunologische Erkenntnisse klar. Da es trotz Fehlens der Gamma-Globuline — die auch die Immunkörper gegen das Vaccinevirus enthalten — bei diesen Patienten zu einem völlig normalen Ablauf der Pockenschutzerstimpfung kommen kann, scheinen die humoralen Abwehrstoffe für die Ausbildung der Vaccineimmunität nicht ausschließlich verantwortlich zu sein. Es muß vielmehr hier noch ein geweblicher Resistenzmechanismus mitspielen.

Schon im Bericht der Académie Royale de Médicine hat Lassus 1845 auf eine Familie hingewiesen, bei der trotz Kontaktmöglichkeiten nie ein Pockenfall aufgetreten ist. Diese Resistenz ist sicher äußerst selten und manchmal auch über eine nicht erkannte Variola sine exanthemate zu erklären.

Kürzlich haben Friedman u. Baron die Bedeutung des geweblichen Anteils der Vaccineimmunität klar herausstellen können. Mit 300 r

* Herrn Prof. Dr. A. Herrlich zum 60. Geburtstag gewidmet.

bestrahlte Meerschweinchen entwickeln normalerweise keine Antikörper. Nun zeigte sich, daß sowohl bestrahlte als auch normale Tiere eine Vaccineinfektion überstehen, obwohl im ersteren Fall keine neutralisierenden Antikörper bis zum 28. Tag p.v. mit empfindlicher Methodik nachzuweisen waren. Die Testung mit abgetötetem Vaccinevirus auf vaccinale Allergie war aber vom 4. Tag an in beiden Gruppen positiv. Durch diese Versuchsanordnung dürfte bewiesen sein, daß die vaccinale Allergie nicht über humorale Vaccineantikörper abläuft, sondern vornehmlich durch gewebliche Faktoren zustande kommt. Eine ähnliche Untersuchung stammt von Herrlich, der bei Kaninchen die Hypophyse vor der Vaccination mit 400 r bestrahlte. Antikörperbestimmungen wurden von ihm nicht durchgeführt, jedoch zeigten sämtliche bestrahlten Tiere eine erhebliche Verstärkung der lokalen und allgemeinen Vaccinereaktion. ACTH- oder Cortisonzufuhr bei der Vaccination von Kaninchen bewirkte ebenfalls eine Verschlimmerung des Infektionsablaufs. Diese Versuche unterstreichen die Rolle, welche die Hormone bei der Auseinandersetzung mit dem Vaccinevirus spielen.

Wie Ehrengut (1961) an Wiederimpflingen zeigen konnte, geht die Vaccineimmunität mit der Überempfindlichkeit gegen das Virus nicht immer Hand in Hand. Wiederimpflinge, die eine Knötchenreaktion aufweisen, können bei vorheriger Testung mit abgetötetem Impfstoff Zeichen vaccinaler Allergie bieten, die bei anderen Impflingen (trotz gleichartiger örtlicher Reaktion bei der Nachimpfung mit aktivem Virus) fehlten. Es ist nur die Frage, ob diese erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Vaccinevirus — wie sie mit dem beschriebenen Test zu erkennen ist — im Hinblick auf die Resistenz des Individuums als Positivum registriert werden kann. Man hat vermutet, daß die „delayed hypersensitivity" bei der Pockenschutzimpfung einen Abwehrmechanismus darstellt. Auf der anderen Seite lassen sich verschiedene Beobachtungen anführen, bei denen eine mangelhafte Immunität über die gleichzeitig vorhandene Hypersensitivität erklärt wurde. Unsere Vorstellungen sind zwar noch im Fluß, doch zeichnen sich bereits klare Umrisse über die Entwicklung der Immunität ab. So wurde jüngst bei den Experimenten von Isaacs u. Lindenmann sowie Nagano u. Kojima mit Interferon ein weiterer Resistenzmechanismus bei der Virusinfektion herausgestellt.

Während die Immunität gegenüber bakteriellen Erkrankungen — wenigstens zum größten Teil — am jeweils vorhandenen Spiegel spezifischer Antikörper gemessen werden kann (siehe Anfälligkeit von Patienten mit Agammaglobulinämie), läßt uns diese Methode bei der Abschätzung der Virusimmunität im allgemeinen im Stich.

Man kann „Virusimmunität" in folgender Variation antreffen:

1. Solide Immunität ohne Viruspersistenz (Typ Gelbfieber, Masern und nach allgemeiner Anschauung auch Pocken).

2. Kurzdauernde Immunität ohne Viruspersistenz (Typ Influenza).

3. Persistenz des Virus im Organismus ohne Entwicklung einer Immunität (Typ Psittakose, der Papagei kann das Virus ständig ausscheiden, bei intraperitonealer Infektion geht er aber ein).

4. Persistenz des Virus trotz Immunität (Typ Papillom des Kaninchens).

Sobernheim schrieb 1927 über die Vaccineimmunität: „mit der vollen Entwicklung der Immunität geht zugleich das Virus zugrunde", und Lépine äußert 1961 über dasselbe Problem, daß es mit dem Auftreten der spezifischen Antikörper zum Verschwinden des Virus komme.

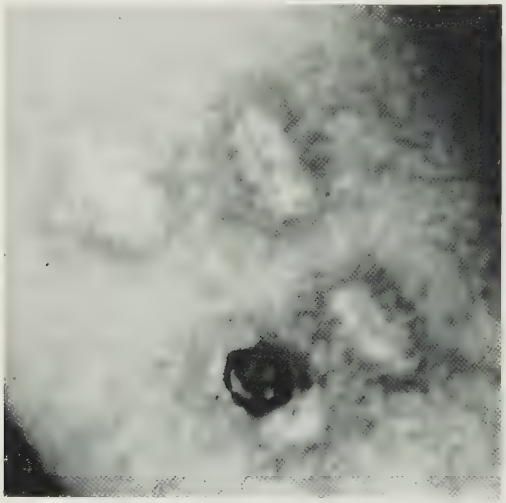


Abb. 1. Impfblatternrezidiv 43 Tage nach der Erstimpfung

Wir verfügen über Beobachtungen, die Zweifel an der allgemeinen Gültigkeit der obigen These aufkommen ließen, weshalb wir sie für mitteilenswert halten:

Fall 1. (Beobachtung von Prof. L. Voigt in der Hamburger Impfanstalt 1908): „Zweimal hintereinander entstanden Impfpusteln am Arm des am 21. 1. 1908 geimpften Kindes. Auf den vier Impfschnitten hatten sich vier Pusteln entwickelt, die wie gewöhnlich abborkten, aber am 4.3. — also 43 Tage nach der Erstimpfung — entstand an einer der Narben eine kleine Papel, die sich innerhalb zweimal 24 Std zu einer kleinen bläulichen Pustel auf rotem Grund entwickelte. Die Areola hatte den Umfang eines Markstückes. Die Pustel bedeckte sich mit einer dicken, trockenen Borke (siehe Abb. 1) und stieß sich nach einigen Tagen ab."

Fall 2. Dieter, M., geb. 8. 6. 1958 (eigene Beobachtung an der Bayerischen Landesimpfanstalt München): Am 8. 5. 1959 war der Junge mit Erfolg gegen Pocken geimpft worden. In der Nacht vom 26./27. 9. 1959 erkrankte das Kind mit Fieber und starker Unruhe. Die Körperwärme wurde nicht gemessen. Als die Mutter das Kind am 27. 9. frühmorgens ankleidete, bemerkte sie eine Rötung im Bereich der früheren Impfstelle. Die Körperwärme betrug morgens 37,2°, mittags 39,6°. Die Mutter zog wegen eines Mundgeruchs eine Kinderärztin zu, die neben der Impfnarbe eine Pustel mit gelblichem Inhalt und einem deutlich roten Hof feststellte, die Ähnlichkeit mit einer Impfpustel zeigte und hinsichtlich ihrer Reife einer Pockenpustel vom 9. Tag p.v. entsprach. Das Kind war inappetent. Die Axillardrüsen rechts waren überkirschkerngroß, jedoch waren auch links die Achseldrüsen etwas vergrößert. Es bestand außerdem eine Stippchen-Angina.

Bei einem Consilium wurde von mir folgende Anamnese erhoben: Die Geburt des Kindes war normal. Geburtsgewicht 3,4 kg. Das Kind konnte mit 7 Monaten sitzen, mit 9 Monaten stehen, mit 15 Monaten laufen. Der erste Zahn kam im

8. Lebensmonat. Im Alter von 6 Monaten trat eine Bronchitis auf, anschließend entwickelten sich Ringelröteln. Im März 1959 hatte das Kind Windpocken. Die Pockenschutzimpfung erfolgte im 11. Lebensmonat. Nach den Angaben der Mutter hatte sich am Nachschautag von den zwei Impfschnitten nur an einer Stelle eine Pustel entwickelt, die sich nach einigen Tagen mit einem mäßigen Entzündungshof und ohne Fiebererscheinungen zurückbildete. Am 30. 9. 1959 lag folgender Befund vor: Normale Körperwärme, Sudamina am Körper und etwas im Gesicht. An der Beugeseite der linken Mittelzehe findet sich eine gut hanfkorngroße Borke, in deren Umgebung in Fingerkuppengröße eine Rötung besteht. Angeblich soll tags zuvor von dort ausgehend ein roter Strang auf dem Fußrücken sichtbar gewesen sein. Am rechten Oberarm ist eine diskrete, weißliche, typische Impfnarbe zu erkennen. Knapp daneben sitzt eine charakteristische in Abheilung befindliche, mit Borke versehene Vaccinepustel, die in ihrer Entwicklung einer Vaccine-Efflorescenz ungefähr des 11. Tages p.v. entspricht. Daneben ist noch eine hanfkorngroße atypische Narbe (zweiter Impfschnitt) nachzuweisen. Zwei kleinkirschkerngroße Axillardrüsen rechts, Rachen gerötet. Die Mutter gestattete nur die Entnahme von geringen Mengen an Material der Kruste zur Eihautkultur: Es ergaben sich fragliche Vaccineherde, jedoch ließ sich bei der zweiten Passage kein Vaccinevirus nachweisen.

Fall 3. Antje S., geb. 22. 10. 1960. Pockenschutzimpfung am 19. 4. 1961. (Beobachtung an der Impfanstalt Hamburg): Bei der Nachschau am 27. 4.: zwei Pusteln. Das Kind hatte nur einen Tag Fieber (38,3°) gehabt. Am 12. Tag p.v. bemerkte die Mutter an der Beugeseite des rechten Unterarmes einen fleckigen Ausschlag. Bei einem Hausbesuch konnte ich Impfpusteln der Norm des 12. Tages entsprechend beobachten. Es fand sich allerdings nur eine geringgradige Drüsenschwellung axillar. Das Kind war fieberfrei und munter. Eigenartigerweise war im wesentlichen nur auf der Beugeseite des rechten Unterarmes (Impfstelle am rechten Oberarm) ein papulo-urticarielles postvaccinales Exanthem zu sehen. Mittels Puderbehandlung Abklingen der Erscheinungen innerhalb 2 Tagen.

Am 27. 10. 1961 (191 Tage p.v.) stellte sich die Mutter mit dem Kind erneut vor. In der Zwischenzeit waren bei ihm außer kleineren Infekten keine besonderen Krankheiten aufgetreten. 3—4 Tage vorher hatte es Schnupfen (die ganze Familie war erkältet). Temperatur morgens 37,6°, Appetit gut, Stuhlgang o. B. Beide Impfnarben (Größe $1 \times 1{,}5$ cm resp. $0{,}8 \times 1{,}2$ cm) wiesen im Zentrum je zwei gelbliche, gut stecknadelkopfgroße Knötchen auf, die sich beim Betasten hart anfühlten. Weiter fanden sich am rechten Ober- und Unterarm zwei rötliche, hirsekorngroße Knötchen, ferner ein gleich großes am linken Oberarm. Die Achsellymphdrüsen waren nicht geschwollen, die rechte Kieferwinkeldrüse war etwas vergrößert, der Rachen gerötet, auf der linken Tonsille fanden sich einzelne Eiterstippchen. Im Blut waren keine hämagglutinationshemmenden Antikörper gegen das Vaccinevirus nachzuweisen. Jedoch fanden sich neutralisierende Antikörper in einem Titer von 1:16. Entnahme von Material zur Kultur. Die Granula auf den Impfnarben ließen sich richtig herausschälen. Auf der Chorioallantois des Hühnerembryos waren auf allen sechs beimpften Membranen ca. 11—12 stecknadelkopfgroße, uncharakteristische, weißliche Herde festzustellen. Auf der zweiten Eihautpassage negativer Befund, ebenso auf den angesetzten Gewebekulturen.

Diskussion

Unser Fall 1 (Prof. Voigt) dürfte die erste Beobachtung eines Vaccinerezidivs in Deutschland sein (siehe Tab. 1). In Frankreich wurden zum selben Zeitpunkt [zit. nach Meder (1930)] dreimal Impfblattern-

rezidive 6, 8 resp. 12 Monate p.v. auf normal abgeheilten Impfnarben beschrieben. In unseren ersten beiden Fällen kann auf Grund der charakteristischen Morphologie der Vaccine kein Zweifel an deren vaccinaler Genese sein, obgleich kein Virusnachweis vorliegt.

Jacobson (1913) hat bei einer 1 Jahr nach der Erstimpfung eines Kindes (eine kleine Impfnarbe) erfolgten Pockenschutznachimpfung gleichzeitig mit einem vollen Schnitterfolg (drei Pusteln) an der alten Impfnarbe kleine „Bläschen" wahrnehmen können, die bis zur Abkrustung der Impfpusteln zu erkennen waren. In diesem Falle lag die

Tabelle 1. *Bisher in Deutschland bekanntgewordene Impfblatternrezidive*

Alter des Impflings (Jahre)	Erst-/Wiederimpfung	Zahl der Erstimpfnarben	Zahl der Rezidivblattern	Rezidiv Tage p.v.	Autor
?	Erstimpfung	4	1	43	Voigt (1908)
10/12	Erstimpfung	4	1	33	Meder (1913)
12	Erstimpfung	3	1	44	Meder (1919)
12?	Wiederimpfung	4	1	20	Meder (1926)
12?	Wiederimpfung	1	2	30	Meder (1928)
12?	Wiederimpfung	3	1	22	Meder (1928)
12	Erstimpfung	4	1	37	Meder (1930)
$2^{8}/_{12}$	Erstimpfung	1	1	38	Meyer zu Hörste (1934)
$1^{6}/_{12}$	Erstimpfung	2	2	107	Kiehl et al. (1957)
$1^{3}/_{12}$	Erstimpfung	2	1	142	Ehrengut (1958)

Möglichkeit von „schlafenden Keimen" (Pirquet) nahe. Bei der Beobachtung von Kiehl et al. (siehe Tab. 1) waren im Laufe einer Sepsis Vaccinerezidive (Virusnachweis) an der alten Impfstelle entstanden, so daß immunologische Vorgänge für die Aktivierung von Vaccinekeimen bedeutsam gewesen sein konnten. Ob im Fall 3 auch Vaccinekeime die Ursache waren, läßt sich mangels Virusnachweis nicht beurteilen, ist aber durchaus möglich.

Die Tatsache, daß noch vermehrungsfähiges Vaccinevirus geraume Zeit post vaccinationem persistieren kann, ist nicht allgemein bekannt. Von der Geflügelpockenerkrankung her wissen wir allerdings, daß das Virus noch bis zu 13 Monaten p.i. zu isolieren ist (Siebert). Mayr u. Herrlich konnten bei Züchtung des Variola-Virus in der Babymaus noch 45 Tage p. i. regelmäßig infektionstüchtiges Virus aus den Lungen züchten. Sarkar et al. zeigten, daß bei diesem Tier bei der Gehirnpassage von Variolavirus die Sterblichkeit zwar anfänglich groß ist; wurde das Virus aber dann weiter passagiert, so überlebten die Tiere die dritte und vierte Passage und machten einen normalen Eindruck. Im Gehirngewebe dieser Tiere konnte jedoch auf der Chorioallantois des Hühnerembryos bis zum 62. Tag p. i. virulentes Variolavirus nachgewiesen werden.

Auch bei einem an Variolois erkrankten 29jährigen Matrosen gelang Alivisatos u. Violaki-Paraskeva der Pockennachweis auf der Eihaut noch 38 Tage nach Krankheitsbeginn im Blut.

Die gleichen Autoren wiesen im Blut von Erstimpflingen noch 73 Tage p.v. auf der Chorioallantois des Hühnerembryos Vaccinevirus nach. Falls diese Befunde eine Bestätigung erfahren, scheinen sie in Verbindung mit obigen Fällen von Impfblatternrezidiv dafür zu sprechen, daß zumindest nach Abheilung der Impfpusteln noch einige Vaccinekeime im Organismus überleben können.

Oft scheint das Gelingen des Nachweises von Vaccinevirus auch eine Frage der Technik zu sein. So konnten Olitsky u. Long bei Kaninchen, die mit Neurovaccine beimpft worden waren, in Haut-, Hoden- und Milzgewebe mit gewöhnlichen Testmethoden nach der Abheilung kein Virus isolieren. Wurden aber Verreibungen dieser Gewebe mittels Kataphorese behandelt, so konnte an der Anode Vaccinevirus gewonnen und über eine Hoden- oder Hautbeimpfung noch nach 114 Tagen aus dem Hodengewebe und nach 133 Tagen aus Milzextrakten virulentes Vaccinevirus isoliert werden. Olitsky u. Casals wiesen ferner noch 9 Monate nach der Infektion des Vaccinevirus nach (weitere Literatur zu diesem Thema bei Olitsky u. Long).

Puntigam u. Orth haben von Jungrindern, die sie zur Impfstoffgewinnung eingestellt hatten, in verschiedenen Abständen nach der Vaccineinfektion Blut entnommen und dieses in Kaninchenhoden injiziert. Das aus dem beimpften Hoden gewonnene Material wurde dann einer elektronenoptischen Prüfung unterzogen, wobei bis zu 22 Tagen p.i. (die Untersuchungen wurden aus äußeren Gründen nicht über längere Zeit fortgesetzt) der Virusnachweis glückte.

Puntigam u. Orth betonten, daß der negative Ausfall eines biologischen Versuchs nicht gegen das Vorhandensein kleinster Virusmengen im zu untersuchenden Material spreche. Wir möchten annehmen, daß auch unsere erfolglosen Virusnachweise im Fall 2 und 3 so gewertet werden müssen. Es wäre sicherlich günstiger gewesen, das gewonnene Material gleich für die empfindlichere Kaninchenhodenbeimpfung (siehe Salchow) zu verwenden.

Besonders interessant ist, daß im Fall 3 der Spiegel an neutralisierenden Vaccineantikörpern in normaler Höhe vorlag. An einer ungenügenden Ausbildung humoraler Abwehrstoffe, die dem etwaigen Virulentwerden schlummernder vaccinaler Keime keinen Widerstand entgegenbrachten, kann es also nicht gelegen haben. Uns scheint die Beobachtung eines vaccinalen Exanthems im Falle von Kiehl (beim Blatternrezidiv) und in unserem Fall 3 p.v. ein Schlüssel zur Lösung des Problems zu sein. Man kann die polymorphen Exantheme post vaccinationem als Ausdruck einer gesteigerten vakzinalen Allergie auffassen. Nach Pirquet sind sie Ausdruck eines immunisatorischen Geschehens (siehe Groth).

Wie wir schon andeuteten, könnte dieser hyperergische Vorgang sich negativ auf die Dauerhaftigkeit der Vaccineimmunität auswirken (siehe Schema der Vaccineimmunität). Bei den postvaccinalen Exanthemen — besonders wenn sie in Form von mit Flüssigkeit gefüllten Blasen auftreten — läßt sich Virus im Sekret nicht nachweisen. Vermutlich kommt es durch die hyperergischen Vorgänge zum baldigen Verschwinden des Virus aus dem Gewebe, doch wird die humorale Antikörperbildung wohl ausreichend stimuliert. Die gewebliche Immunität erhält aber wie bei einem Strohfeuer nur einen geringen Impuls, der auf die Dauer gesehen ungenügend sein kann. So ließen sich die bei Wiederimpflingen mit vaccinaler Überempfindlichkeit trotz scheinbar positiver Immunitätsreaktion beobachteten Pockenerkrankungen erklären.

Nach Überstehen der Vaccineinfektion bilden sich in der Regel neutralisierende und hämagglutinationshemmende, manchmal auch komplementbindende und präcipitierende Antikörper aus. Es ist bekannt, daß die Höhe des Antikörpertiters nicht unbedingt einen Rückschluß auf den Grad der erzielten Immunität erlaubt, ja daß sogar bei fehlenden hämagglutinationshemmenden und komplementbindenden Antikörpern eine Immunität vorliegen kann (Herrlich et al.). Über den Verlust der neutralisierenden Antikörper nach erfolgreicher Pockenschutzimpfung wurde, sow' uns bekannt, bisher nicht berichtet. In diesem Zusammenhang ist deshalb folgende Beobachtung erwähnenswert:

Der $13^1/_2$jährige Hans-Joachim G. stellte sich mit seinen Eltern zur Durchführung der gesetzlichen Wiederimpfung vor. Es war eine Impfbescheinigung über eine zweimal erfolglos vorgenommene Pockenschutzimpfung in der Kindheit vorhanden. Bei Inspektion der Arme auf Impfnarben beobachteten wir an typischer Stelle zwei im Abstand von ca. 3 cm parallel laufende weißliche Schnittnarben von ca. 0,8 cm Länge und 0,2 cm Breite. Die Eltern, denen wir unsere Vermutung äußerten, daß jene Narben Ausdruck einer sehr schwach abgelaufenen Impfreaktion sein könnten, vermochten nur zu bestätigen, daß sie sich nicht an eine Verletzung erinnerten, die solche Narben hervorgerufen haben könnte.

Bei der Blutabnahme wurden mit der empfindlichen Methodik (nach Bonitz) keine neutralisierenden Vaccineantikörper nachgewiesen. Da wir unserer Sache aber ziemlich sicher waren, wandten wir formalininaktiviertes Vaccinevirus an, das nach unseren Untersuchungen (1961) einen Booster-Effekt bei Wiederimpflingen auslöst. In der Tat war 14 Tage nach Gabe von 1,0 ml Vaccineantigen ein Neutralisationstiter von 1:1 vorhanden. (Bei Ungeimpften kommt es nie zu unspezifischem positivem Ausfall, auch konnten wir nach der ersten Gabe von Vaccineantigen niemals neutralisierende Antikörper bei Nichtgeimpften feststellen, frühestens nach der zweiten Injektion.) Zeichen vaccinaler Allergie waren bei dem Impfling post injektionem nicht vorhanden. 49 Tage p. i.

war der Neutralisationstiter immer noch unverändert (1:1). Es wurde nun eine normale Wiederimpfung durchgeführt. Am 7. Tag p.v. war eine Bläschenreaktion festzustellen. Der Titer an neutralisierenden Anti-

Tabelle 2. *Schema der vaccinalen Immunität*

	Immunität	
	Vaccinale Hyperergie	Neutralisierende Antikörper p.v.
Erstimpfung		
Normale Impfreaktion	+	+
Morbilliforme postvaccinale Exantheme	++	+
Bullöse postvaccinale Exantheme	+++	(+)?
Generalisierte Vaccine	(+)	(+) verzögert
Hypogammaglobulinämie mit normaler Abheilung der Vaccine	+	[(+)]
Agammaglobulinämie mit normaler Abheilung d. Vacc.	+	∅
Agammaglobulinämie mit Vaccinia progressiva	∅	∅
Wiederimpfung		
Hyperergische Knötchenreaktion	+++	+(+)
Immunitätsreaktion	++	++
Bläschenreaktion	+(+)	++(+)
Pustel von beschleunigtem Verlauf	+	+ + +

Erklärung zu Tab. 2. Die Abnahme der Intensität der hyperergischen Reaktion ist mit + + + bis + gekennzeichnet. Die Zeichen (+) bzw. ∅ sollen eine gewebliche Hypergie bzw. Anergie gegenüber dem Virus andeuten. Dies ist bei generalisierter Vaccine und Agammaglobulinämie mit progressiver Vaccine (Virusnachweis über den üblichen Zeitpunkt des Immunitätseintritts hinaus möglich) der Fall. Bei Wiederimpflingen nimmt in gewisser Analogie die Chance, das Virus von der Impfstelle zu isolieren, mit der Abnahme der Intensität der hyperergischen Reaktionen zu. Soweit sich bis jetzt übersehen läßt, ist eine Vorhersage des Reaktionsausfalles der Wiederimpfung aus dem Titer an neutralisierenden Antikörpern nur in etwa möglich. Eine enge Korrelation scheint nicht zu bestehen. Es besteht aber nach unseren bisherigen Untersuchungen kein Zweifel darüber, daß nach einer Pustelreaktion höhere Titer an neutralisierenden Antikörpern entstehen als nach einer Knötchenreaktion. Als sicher darf man auch annehmen, daß es keine humorale Immunität ohne histogene Reaktion gibt, während die umgekehrte Konstellation u. U. vorliegen kann.

körpern betrug jetzt 1:5. Hämagglutionationshemmende Antikörper konnten bei keiner Untersuchung nachgewiesen werden.

Camus war der Anschauung, daß die histogene Immunität welken könne, das Blut bleibe aber noch virulicid. Dieser Fall zeigt aber eindeutig, daß bei der Vaccination die histogene Immunität die humorale überdauert. Dies beweisen auch die Beobachtungen über den Reaktionsablauf bei Variolois (Herrlich). Das raschere Verschwinden der humoralen Immunität ist die Regel und hat das fieberhafte Initialstadium zur Folge, während die Persistenz einer geweblichen Immunität in unterschiedlicher Stärke das polymorphe Bild der Hauterscheinungen prägt. Der oben angeführte Fall zeigt ferner, daß scheinbar erfolglose Impfungen doch erfolgreich sein können [Ehrengut (1959)]. Die Experimente von Friedman u. Baron haben bewiesen, daß nach der Vaccineinfektion zuerst eine hyperergische Reaktion des Gewebes eintritt und sich erst dann humorale Antikörper einstellen. Insofern dürften für die normale Abheilung der Infektion die geweblichen Faktoren maßgeblicher sein als die humoralen (siehe Schema der vaccinalen Immunität: Fälle von Agammaglobulinämie mit und ohne normale Abheilung der Vaccine).

Daß es trotz der Existenz neutralisierender Antikörper zu einer Viruspersistenz kommen kann, ist an sich nicht verwunderlich, denn es gelingt nicht, Vaccinevirus bei ausreichendem Zusatz von Hyperimmunserum vollständig zu neutralisieren (Boulter).

Bereits 1887 hat Pfeiffer vermutet, daß ein Geimpfter das Vaccinevirus unbeschränkt lange beherberge, die Immunität aber verlorengehe, wenn es aus dem Körper verschwindet. Obgleich unsere Beobachtungen nur gewisse Hinweise dafür geben, daß das Virus noch längere Zeit nach der Abheilung der Impfblattern im Organismus (vor allem in der Gegend der eigentlichen Impfstelle, vielleicht in Form „schlafender Keime") existent und vermehrungsfähig sein kann, gibt dieser Befund doch zu denken. Vor allem in Fall 2 und 3 waren an der Zehe bzw. an den Extremitäten auf Vaccine verdächtige Efflorescenzen vorhanden, die an eine Aussaat denken ließen, obgleich der Beweis hierfür aussteht. Wir müssen es demnach auf Grund der obigen Kasuistiken als durchaus für möglich ansehen, daß das Virus in abgeschwächter Form auch nach der Impfung eine Zeitlang noch persistiert und daß bei Schwankungen der Immunitätslage, z. B. unter dem Einfluß eines Infekts, dieses Gleichgewicht von Makro- und Mikroorganismus gestört wird, wobei Blatternrezidive auftreten können. Weitere Untersuchungen mit empfindlicher Methodik können hier Licht in das Dunkel bringen.

Zusammenfassung

Zwei Fälle von Impfblatternrezidiven 43 resp. 142 Tage p.v. wurden mitgeteilt. In einem dritten Fall traten während eines Infektes uncharakteristische „Granula" an der alten Impfnarbe auf, so daß der Verdacht auf eine vaccinale Genese bestand.

Es wurden die dabei auftauchenden Probleme der vaccinalen Immunität besprochen. Es hat nicht den Anschein, daß das Vaccinevirus nach Abheilung der Infektion in jedem Falle durch Autosterilisation vernichtet wird. Die Gründe hierfür wurden dargelegt, und es wurde ein Schema der vakzinalen Immunität aufgestellt. An einem Einzelbeispiel konnte gezeigt werden, daß die histogene Vaccineimmunität die humorale überdauert.

Literatur

Alivisatos, G. P., u. M. Violaki-Paraskeva: Die Viraemiedauer nach Vakzination und Variolaerkrankung. Z. Immun.-Forsch. **117**, 250 (1959).

Benenson, A. S.: Immediate (so-called "immune") reaction to smallpox vaccination. J. Amer. med. Ass. **143**, 1238 (1950).

Boulter, E. A.: The titration of vaccinial neutralizing antibody on chorio-allantoic membranes. J. Hyg. (Lond.) **55**, 502 (1957).

Camus: zit. nach P. Gastinel: Thèse pour le Doctorat en Médicine, p. 41. Paris: Faculté de Médicine 1913.

Ehrengut, W.: Probleme und Ursachen der erfolglosen Pockenschutzimpfung. Dtsch. med. Wschr. **84**, 2158 (1959).

Ehrengut, W.: Über den Nachweis der vakzinalen Allergie mit formalininaktiviertem Vakzinevirus bei narbenlosen Wiederimpflingen. Dtsch. med. Wschr. **86**, 264 (1961).

Friedman, R. M., and S. Baron: The rôle of antibody in recovery from infection with vaccinia virus. J. Immunol. **87**, 379 (1961).

Groth, A.: Die Schwankungen im Ablauf der vaccinalen Infektion, ihre Anomalien und Komplikationen. Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. **49**, 480 (1935).

Herrlich, A.: Die Pocken. Stuttgart: G. Thieme 1960 (dort weitere Literatur).

Höcht, H.: Über eine abnorme Spätreaktion der Pocken-Vaccination nach Poliomyelitis-Schutzimpfung. Inaug.-Diss. München 1960.

Isaacs, A., and J. Lindenmann: zit. nach J. Lindenmann: Neuere Aspekte der Virus-Interferenz. Ergebn. Mikrobiol., Immun.-Forsch. **33**, 369 (1960).

Jacobson, G.: Réaction inflammatoire à l'occasion d'une nouvelle vaccination, au niveau d'une cicatrice vaccinale datant de un an. C. R. Soc. Biol. (Paris) **65**, 236 (1913).

Kiehl, W., J. Potel u. S. Hlawatsch: „Spätkomplikation" nach Pockenschutzimpfung im Verlauf einer otogenen Sepsis. Arch. Kinderheilk. **156**, 173 (1957).

Lassus: zit. in: Rapp. l'Acad. Roy. de Médicine sur les vaccinations en France 1845, p. 36.

Mayr, A., u. A. Herrlich: Züchtung des Variolavirus in der infantilen Maus. Arch. ges. Virusforsch. **10**, 226 (1960).

Meder, E.: Zwei Fälle von verspäteter Abheilung der Impfpusteln. Dtsch. med. Wschr. **39**, 73 (1913).

Meder, E.: Ein Fall von Impfblatterrückfall. Hyg. Rdsch. **29**, 429 (1919).

Meder, E.: Zwei Fälle von gestörtem Impfverlauf. Dtsch. med. Wschr. **56**, 99 (1930).

Meyer zu Hörste, G.: Über Immunitätsschwankungen bei Infektionskrankheiten. Mschr. Kinderheilk. **61**, 94 (1934).

Nagano, Y., et Y. Kojima: Interférence du virus vaccinal inactif avec l'infection du tissu dermique par le virus homoloque actif: C. R. Soc. Biol. (Paris) **152**, 372 (1957).

Nagano, Y., Y. Kojima et T. Suzuki: Inhibition de l'infection vaccinale par un facteur liquide dans le tissu infecte par le virus homologue. II. Quelques proprietes biochemiques du facteur inhibiteur. C. R. Soc. Biol. (Paris) **154**, 2166 (1960).

Nataf, R., P. Lefine et G. Bonamour: Oeil et Virus, p. 106. Paris: Masson & Cie. 1960.

Olitsky, P. K., and J. Casals: zit. nach Sarkar u. Mitarb.: Bull. N. Y. Acad. Med. **21**, 356 (1945).

Olitsky, P. K., and P. H. Long: Relation of vaccinal immunity to the persistence of the virus in rabbits. J. exp. Med. **50**, 263 (1929).

Pfeiffer: zit. nach Olitsky and Long.

Puntigam, F., u. E. Orth: Über den Nachweis des Vaccinavirus im Blut von zur Impfstoffgewinnung dienenden Jungrindern. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **136**, 319 (1953).

Salchow, U. A.: Diagnostische Möglichkeiten bei Infektionen mit einem Virus der Variola-Vaccinia-Gruppe. Arch. Hyg. (Berl.) **139**, 608 (1955).

Sarkar, J. K., K. N. Neogy and D. C. Lahiri: Behaviour of variola and vaccinia viruses in mice. J. Indian med. Ass. **32**, 279 (1959).

Siebert: zit. nach Sobernheim, p. 882.

Smeets, M. S. J. G. H., and J. M. Soeters: Verwikkelingen na inenting tegen pokken. Maandschr. Kindergeneesk. **19**, 325 (1951); ref. Excerpta med. (Amst.). Sect. VIII, **5**, 552 (1952).

Sobernheim, G.: In: O. Lentz u. H. A. Gins: Handb. d. Pockenbekämpfung und Impfung, p. 821. Berlin: Schoetz 1927.

Voigt, L.: Jahresbericht der Staatl. Impfanstalt Hamburg, 1908.

Dr. W. Ehrengut,
Impfanstalt, Hamburg 1, Brennerstr. 81

Zeitschrift f. Hygiene 148, 241—255 (1962)

From the Department of Clinical Therapeutics
of the Athens University Medical School at the Alexandra Hospital
(Director: Prof. B. Malamos)

Faecal Flora in protozoal and common Colitis Changes after Therapeutic use of Intestinal Antiseptics*

I. Paromomycin

By
B. Malamos, G. K. Daikos, P. Kourkoumeli-Kontomichalou
and E. Pinetidou

(Received Oktober 6, 1961)

Paromomycin is known to be active against the bacteria of the intestinal flora and in protozoal colitis, not being absorbed from the gastrointestinal tract but in a negligible quantity. Its activity on the faecal flora is such that it has been used in a limited scale wherever an intestinal antisepsis is needed, mainly in the treatment of hepatic coma, with satisfactory results. Its use in intestinal protozoal disease, namely amebiasis, has been thus far gratifying[1,2].

We are faced in Greece with a chronic colitis problem, which is not clearly elucidated up to the present. In older days the impression prevailed that the majority of such colitis cases was of an amebic nature. Amebiasis was diagnosed in many cases, where non specific, chronic intestinal disturbances existed, and many times even without intestinal phenomena. Although we cannot claim that we have solved the colitis problem, which is to our opinion a conglomeration of various conditions, poorly understood at the present, we have been systematically examining all chronic colitis cases for 4 years now. It seems strange to many of the colleagues that no more than the very low percentage of 2% of colitis cases (not of the population in general) are due to amebiasis. We have thus far screened more than 3.000 of such cases, hospitalized and not in our Department who came with colitic complaints. Having set strict criteria of exact laboratory diagnosis we have not been able to detect intestinal protozoa in more than 2% percentage (Malamos et al. unpublished data).

In an effort to throw some light to the everyday problem of chronic colitis we are evaluating the various drugs in use, as well as new ones, as to their effect on the proven amebiasis cases and mainly on the faecal flora of normal individuals and of patients with colitis.

* Work supported by the Royal Research Foundation of Greece.

As difficult and uncertain the study of intestinal flora has proven to be[1,3,4], we have attempted to make quantitative estimations of it before and after the administration of an intestinal antiseptic in healthy individuals and in colitis cases. We include normals in order to evaluate our method and establish a baseline. We have not been able to study more cases of amebiasis and lambliasis up to the present. A larger series is going to be reported at a later date.

Materials and methods

This study concerns a) 12 cases of protozoal enterocolitis, which have been treated by paromomycin, b) four diarrhoeal syndromes, two hepatic comata, three healthy individuals and five cases of protozoal enterocolitis, on which a study of the faecal flora has been performed before and after the administration of paromomycin, c) another six individuals with and without intestinal disease, the faecal flora of which has been studied in greater detail quantitatively, before and after the use of paromomycin. All patients of the present study were hospitalized in the Department of Clinical Therapeutics of the Athens University Medical School, at the Alexandra Hospital.

The methods of the bacteriological study of the faecal flora were of two types: a) the majority of cases were followed up by a grossly quantitative method, consisting in Gram stained smears and cultures in different media, without the use of faecal dilutions. b) a more detailed method of cultures of serial dilutions of faeces on the proper media, including anaerobes. The gross quantitative method is the same as described in another paper[7].

A loopful of stool specimen was diluted in 5 ml of nutrient broth, from which the following media were inoculated: blood agar, McConkey's agar, S-S agar, Sabouraud's agar. The latter contained 0,5 mg of actidione/ml and chloramphenicol 50 mcgm/ml. This chloramphenicol concentration did not inhibit all enterobacteriaceae. Towards the end of the present investigation we substituted Sabouraud's agar with Raulin medium, which we found more satisfactory.

The second more detailed quantitative method was performed as follows: A sample of 10—15 gm of faeces was homogenized in a sterile container with nutrient broth in a proportion of 1:10. From this homogenized 10^{-1} faecal suspension further tenfold dilutions were done in nutrient broth. These tenfold dilutions were streaked over the proper nutrient media as: blood agar, MacConkey agar, S-S medium, Raulin medium (for fungi). Anaerobes were cultured in Petri dishes with a thin layer of nutrient agar, on which the faecal dilution was streaked. On top of this agar a special agar in a thick layer (50—60 ml per dish) was poured, creating thus anaerobe conditions. The special agar was made as follows: to common agar 20% glucose was added and right before its use a 20% sulfite solution, in a proportion of 10% and another 5% solution of Alum, in a proportion of 1% was mixed. By reduction of the sodium sulfite, the indicator (Alum) stained the colonies of the anaerobes black. Only the large colonies were considered[5].

Enterococci were looked for either by placing the faecal dilutions in a 60°C waterbath for 2 hours, and then inoculating them on blood agar, or by extracting the faecal dilutions with equal volume of ether, discarding the supernate and inoculation of the residue on blood agar.

Results are expressed a) as percentages of the total flora, as judged from the Gram stained smears, b) as one to four + growth of the various bacterial species, as seen in the cultures of the gross quantitative method, c) as numbers of colonies grown in each tenfold dilution in the more detailed quantitative method.

Results

Anti-protozoal action. We have treated 12 cases of protozoal enterocolitis, which are analysed as follows: four cases with endamoeba histolytica vegetative forms, six cases with endamoeba histolytica cysts, one case with giardia lamblia vegetative forms, one case with giardia lamblia cysts. Two of the patients were 8 year old children, one with amebiasis and the other with lambliasis. The others were adults. All cases had gastrointestinal disturbances, which were more pronounced (overt diarrhoea) in the carriers of vegetative forms of endamoeba histolytica and both forms of giardia lamblia.

The administered daily dose of paromomycin was 1,50 gm for the adults and 1 gm for the children, divided in equal parts and taken after meals.

In all cases which received paromomycin a favourable effect on the symptoms and signs of the disease was seen. This effect did not occur immediately in all patients, but in the majority there was an initial phase with slight exacerbation of the gastrointestinal disturbances. Mild pains (usually colicky) in the hypogastrium and 3—4 loose stools daily. These phenomena did not oblige us to interrupt the administration of the drug. On the contrary upon continuing it a definite improvement occurred.

The clinical improvement was accompanied by laboratory disappearance of the protozoa, usually as soon as the third day of treatment. In all cases the stools became negative by the end of the 6 day of treatment. One exception is a patient who had contracted amebiasis in the Tropics. He had an abundance of active trophozoites and an acute form of real amebic dysentery. Paromomycin treatment was followed by clinical improvement and disappearance of the amoebae from the stools. This did not last long, but after a week of discontinuation of the drug a clinical and laboratory recurrence occurred. A complete follow up study of all cases has not been possible, but in the majority of them even after two months of treatment, the stools remained negative of protozoa and the clinical improvement persisted.

Side effects except the mild ones reported above (hypogastric mild pains and 3—4 loose stools) did not occur. In half of the cases bulky stools were observed during the last days of treatment. These stools contained undigested food.

a) Gross quantitative studies on healthy individuals and protozoal colitis. We describe both groups together, because the faecal flora was found within normal margins before treatment (Table 1). Faecal flora has been found abundant (++++) in all cases (three healthy and five protozoal colitis). In the Gram stained smear it consisted mainly of Gram negative bacteria, which were 75—95% of the total flora. Cultures

revealed: E. coli, abundant in all except two cases, non lactose fermenters (Lac. —) grown in small numbers in six of eight persons, Klebsiella pneumoniae, found in small numbers in half of the individuals, Proteus, grown in one person only. Enterococci were observed in the plain smear

Table 1. *Bacteriological observations on faeces of eight healthy*

Number of case	Days of examination	Stool consistensy	Gram stained smears. Percentages of total flora							
			Gram + cocci		Gram −	Gram +	Spirochetes	Fungi		Spore bearing
			Staphylococci	Enterococci	Bacilli	Bacilli		Yeasts	Geotrichum	
1	Before 1	Solid	1	4	90	2	1			2
	After 7	Solid bulky		88	10	2				
2	Before 1	Solid		8	85	6				1
	After 7	Solid		3	92	2		3		
3	Before 1	Loose		14	80	3			1	2
	After 7	Solid		3	92	2		1	2	
4	Before 1	Solid		12	80	5				3
	After 7	Solid		6	90	3				1
5	Before 1	Loose		2	90	3		4	1	
	After 7	Solid bulky		30	40	5		5	20	
6	Before 1	Loose		10	74	10		2		4
	After 7	Solid		3	90	4		3		
7	Before 1	Solid		15	75	8	1			1
	After 7	Solid		5	90	3				2
8	Before 1	Solid		3	95	1				1
	After 7	Solid bulky		8	50	40		2		

in all cases (2—15% of the total flora) grown in small numbers in seven of eight cases. Less frequent findings were: Fungi (in three cases), Staphylococcus (in one) in scanty numbers.

In the Gram stained smear spore bearing anaerobes were seen in seven of eight cases in scanty numbers and Gram positive bacteria in all people also in small numbers.

Paromomycin effect on the intestinal flora. Dose: 1,5 gm daily for 6 days. As it is shown in table I there is no uniform response. In two cases (No. 1 and 8) the antibiotic caused a great decrease of the flora (from ++++ to +), in one case (No. 5) a moderate, while in the other five cases the flora remained abundant as before treatment. The observed depression of the flora in the three cases concerned mainly the Gram

negatives. E. coli vanished completely in one case (No. 8) and almost completely in the other two cases. In these three cases the Gram positives increased (Enterococci greatly in the case No. 1). In one case (No. 5) Geotrichum was found increased.

individuals and protozoal colitis cases treated with paromomycin

	Cultures									
Quantity of total flora	Gram − Bacilli					Gram + cocci		Fungi		Gram + bacilli
	Escherichia coli	Klebsiella	Lactose −	Pseudomonas	Proteus	Enterococci	Staphylococci	Candida	Geotrichum	B. Subtilis
++++ Abundant	++++	++				+	+			
+ Rare	±					+++				
++++ Abundant	++++		+			+				
++++ Abundant	++	++		++				+		
++++ Abundant	+++		++			++			+	
++++ Abundant	++++		+			+			+	
++++ Abundant	+++		++			++				
++++ Abundant	++++	+				+				
++++ Abundant	+++	+	++					+	+	
++ Moderate	+	++	+			++		+	+++	
++++ Abundant	++	++	++		++	+		+		
++++ Abundant	+++	+			++			+		
++++ Abundant	+		++++			++				
++++ Abundant	+++	++	+			+				
++++ Abundant	+++	++				+				
+ Rare		+				+				++

In all five cases where the intestinal flora remained abundant after treatment, there was a proportional increase of the Gram negative bacteria (apparent also in the direct smear), especially of E. coli. Klebsiella also has been increased, having appeared in three cases where it did not exist before treatment. Non lactose fermenters decreased or vanished completely. In one case Pseudomonas appeared. Proteus was not influenced in the case where it existed before.

In all five cases Enterococci, Spore bearing Anaerobes, Gram positive bacteria in general and Spirochetes diminished.

Fungi remained unchanged in two and appeared for the first time in another two (in small numbers) cases.

b) Gross quantitative studies on various diarrhoeas (Table 2, No. 1—4). We present briefly each of the four cases of diarrhoeas of various origin

that we treated with paromomycin, because of the particular interest that they present.

1. K. M., 25 y. old female. Ulcerative colitis. Entered the hospital for high fever and 6—7 mucopurulent stools daily. Intestinal flora poor (previous use of

Table 2. *Bacteriological observations on faeces of four cases of diarrheal*

Number of case	Days of examination	Stool consistensy	Gram stained smears. Percentages of total flora						
			Gram + cocci		Gram −	Gram +	Spirochetes	yeasts	Spore bearing
			Staphylococci	Enterococci	Bacilli	Bacilli			
1	Before 1	Solid scarcely haemorrag.		10	70	15		1	4
	After 5	Watery haemorrag.		rare	rare			rare	
	Before 1	Diarrhoeal bloody-purulent		12	80	5		1	2
2	After 5	Solid scarcely haemorrag.		50	42	6		2	
	After 8	Solid scarcely haemorrag.		85	10	2		3	
3	Before 1	Loose		30	45	15		5	5
	After 7	Solid		5	90	1		4	
4	Before 1	Loose		50	30	10		8	2
	After 3	Diarrhoeal		10	40	15		35	
	After 4	Diarrhoeal							
5	Before 1	Loose		15	50	30		1	4
	After 5	Solid		4	88	5		3	
	After 14	Loose		2	82	1		15	
6	Before 1	Loose	1	15	68	12		2	2
	After 12	Solid		65	15	10		10	

antibiotics??). Gram negatives represented about 20% of the total flora. She was given a mild intestinal antiseptic (AI 307) for a few days with beneficial effects. Stools became well formed (only 2 a day), slightly haemorrhagic. Faecal flora became nearly normal. She was then placed on Paromomycin (1,5 gm daily). On the second day of treatment stools increased in number, became watery and bloody. The fever recurred. Stool cultures on the fifth day of treatment did not grow but very rare colonies of Pseudomonas. In the plain smear almost nothing was seen, except very rare Gram negative bacteria, Enterococci and Fungi.

2. Bas K. 30 y. old female. Ulcerative colitis. Moderate fever, 4—5 mucopurulent stools daily. Initial flora abundant, with almost normal proportions of the different microorganisms. She received 1,5 gm paromomycin daily for 7 days. A definite clinical improvement followed. The fever subsided and the stools became better, with a slight blody tinge, while their number remained the same. Intestinal

syndrome and two cases of hepatic comaxtreated with paromomycin

Quantity of total flora	Cultures								
	Gram − Bacilli					Gram + cocci		Candida	Gram + bacilli
	Escherichia coli	Klebsiella	Lactose −	Pseudomonas	Proteus	Enterococci	Staphylococci		B. Subtilis
++++ Abundant	+++	++				+			
± almost absent				+					
++++ Abundant	++++		+			+		+	
++ Moderate	+	++	+			+++		+	
+ Rare		+++				++++		+	
++ Moderate	++		++			+++		+	
++++ Abundant	++++	++				+		+	
++ Moderate	++				+	++++		+	
+ Rare	±					+		++	+
± Almost absent								++	
+++ Numerous	++		++			++		+	
++++ Abundant	++++	++				+		+	
++++ Abundant	++	+			++++			++	
+++ Numerous	++		++			++	+	+	
++ Moderate		+				++++		++	

flora generally decreased. Gram negatives greatly decreased, E. coli vanished completely, substituted by Klebsiella. Enterococci increased (constituting 85% of the total flora by the eighth day). Fungi and other Gram positive bacteria remained unchanged.

3. A. D., 40 y. old male. Non specific mild colitis. About two loose stools daily. Intestinal flora generally decreased. Gram negatives and especially E. coli decreased. Enterococci, Gram positive bacilli and Fungi proportionally increased. Paromomycin was given in a dose of 1,5 gm for 6 days. A subjective general improvement

was accompanied by stool normalization. Intestinal flora generally increased. Gram negatives and namely E. coli increased, Enterococci decreased. The non lactose fermenters and Spore-bearers vanished and Klebsiella appeared. Fungi were not influenced.

4. S. Dr., 50 y. old man. Non specific colitis with 3—5 loose or watery stools daily. Initial faecal flora generally decreased. Gram neg. and especially E. coli proportionally decreased, Enterococci greatly increased. Proteus and Fungi in

Table 3

Gram-stained smears from faeces before and after administration of paromomycin

Cases	Before treatment					After treatment				
	Bacilli gram − %	Bacilli gram + %	Entero-cocci %	Spore bearing %	Fungi %	Bacilli gram − %	Bacilli gram + %	Entero-cocci %	Spore bearing %	Fungi %
1	90	4	6	+	—	85	7	7	+	1
2	97	1	2	+	+	88	8	4	++	+
3	90	2	8	++	—	89	1	10	—	—
4	90	2	4	4	—	93	4	3	—	+
5	89	3	7	1	+	5	40	55	—	+
6	87	5	8	+	+	5	65	30	+	+

Table 4

Quantitative determination on faecal flora before and after administration of paromomycin

Case I

Dilutions	Before treatment						After treatment					
	Escherichia coli	Klebsiella	Lactose −	Strept. fecalis	Anaerobes	Yeasts	Escherichia coli	Klebsiella	Lactose −	Strept. fecalis	Anaerobes	Yeasts
10^{-1}	A	+	++	+	+	—	N	—	—	++	—	—
10^{-2}	A	+	++	+	2	—	N	—	—	++	—	—
10^{-3}	N	+	++	+	1	—	115	—	—	15	—	—
10^{-4}	N	+	++	+	—	—	18	—	—	13	—	—
10^{-5}	45	1	33	9	—	—	9	—	—	11	—	—
10^{-6}	15	—	11	3	—	—	—	—	—	10	—	—
10^{-7}	5	—	—	2	—	—	—	—	—	18	—	—
10^{-8}	2	—	—	1	—	—	—	—	—	10	—	—
10^{-9}	1	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—
10^{-10}	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Note: A = Abundant; N = Numerous; + = Positive.

small numbers. Paromomycin was administered for 3 days only (1,5 gm daily). Stools from the second day on increased in number. Intestinal flora greatly decreased, mainly the Enterococci. On the fourth day (after a total dose of 4,5 gm paromomycin) all bacteria vanished, only a few colonies of yeasts grew out.

c) Hepatic comata. 5. Th. L., 70 y. old man. Homologous serum jaundice. Initial total flora slightly decreased, Gram positives moderately increased. Paromomycin was given in a dose of 4 gm for 2 days and 3 gm for 3 days. On the fifth day

the total faecal flora, the Gram negatives and namely E. coli increased. Klebsiella appeared. After an additional treatment of 7 days with 1,5 gm daily, the faecal flora remained still abundant, with a high percentage of Gram negatives. Proteus appeared and Fungi increased moderately.

6. Mor. P., 60 y. old lady. Hepatic cirrhosis. Initial intestinal flora and especially Gram negatives slightly diminished. After 10 days of 1,5 gm paromomycin daily faecal flora decreased in general, especially Gram negatives (E. coli vanished), while the Enterococci increased greatly, the Fungi moderately and Klebsiella appeared in small numbers.

d) More detailed quantitative studies on various cases. 1. K. I., 26 y. old man. Lung cancer. Normal stools. (Tables 3, 4). On the third day of paromomycin administration (after 3,5 gm total dose) profuse diarrhoea appeared and the drug was discontinued. Faecal flora generally not diminished. Gram negatives diminished. Non lactose fermenters and Anaerobes vanished. Enterococci and Gram positive bacilli slightly increased. Fungi did not appear.

2. S. N., 60 y. old man (Tables 3, 5). Lung cancer. Normal stools. After 6 days on 1,5 gm paromomycin daily, no change in number of stools. Faecal flora generally increased. Gram negatives slightly decreased. E. coli proportionally increased. Klebsiella and

Table 5. *Quantitative determination on faecal flora before and after administration of paromomycin*
Case II

Dilutions	Before treatment								After treatment							
	Escherichia Coli	Klebsiella	Lactose −	Strept. fecalis	Staphy-lococcus Albus	Sarcinae	Anaerobes	Yeasts	Escherichia Coli	Klebsiella	Lactose −	Strept. fecalis	Staphy-lococcus Albus	Sarcinae	Anaerobes	Yeasts
10^{-1}	A	+	+	+	+	+	+	+ +	A	|	|	|	|	|	|	+ +
10^{-2}	N	+	+	+	+	+	**1**	+ +	A	|	|	|	|	|	|	+ +
10^{-3}	N	+	+	⊣	+	+	|	|	N	|	|	|	|	|	|	|
10^{-4}	N	+	+	⊣	+	+	|	|	N	|	|	|	|	|	|	|
10^{-5}	4	11	1	5	**1**	+	|	|	50	|	|	|	|	|	|	|
10^{-6}	4	4	|	1	**1**	6	|	|	8	|	|	|	|	|	|	|
10^{-7}	|	|	|	1	**1**	|	|	|	3	|	|	|	|	|	|	|
10^{-8}	|	|	|	|	**1**	|	|	|	2	|	|	|	|	|	|	|
10^{-9}	|	|	|	|	**1**	|	|	|	1	|	|	|	|	|	|	|
10^{-10}	|	|	|	|	|	|	|	|	1	|	|	|	|	|	|	|

Note: A = Abundant; N = Numerous; + = Positive

Anaerobes vanished. Fungi remained unchanged. Enterococci and Gram positive bacilli proportionally increased.

3. G. Chr., 69 y. old man. (Tables 3,6). Recovering from a cerebrovascular accident. Normal stools. Paromomycin 1,5 gm daily for 7 days did not cause any change

Table 6

Quantitative determination on faecal flora before and after administration of paromomycin

Case III

Dilutions	Before treatment					After treatment				
	Escherichia Coli	Lactose −	Strept. fecalis	Anaerobes	Yeasts	Escherichia Coli	Lactose −	Strept. fecalis	Anaerobes	Yeasts
10^{-1}	A	N	—	N	—	A	—	—	—	—
10^{-2}	N	N	—	75	—	A	—	—	—	—
10^{-3}	N	N	—	28	—	A	—	—	—	—
10^{-4}	N	N	—	4	—	N	—	—	—	—
10^{-5}	70	15	—	1	—	N	—	—	—	—
10^{-6}	28	5	—	—	—	165	—	—	—	—
10^{-7}	20	2	—	—	—	98	—	—	—	—
10^{-8}	12	2	—	—	—	75	—	—	—	—
10^{-9}	9	1	—	—	—	60	—	—	—	—
10^{-10}	4	—	—	—	—	38	—	—	—	—

Note: A = Abundant; N = Numerous; + = Positive.

Table 7

Quantitative determination on faecal flora before and after administration of paromomycin

Case IV

Dilutions	Before treatment						After treatment					
	Escherichia Coli	Lactose −	Klebsiella	Strept. fecalis	Anaerobes	Yeasts	Escherichia Coli	Klebsiella	Lactose −	Strept. fecalis	Anaerobes	Yeasts
10^{-1}	A	A	+	10	++	—	A	N	—	—	—	++
10^{-2}	A	A	—	—	20	—	N	N	—	—	—	—
10^{-3}	A	N	—	—	15	—	180	53	—	—	—	—
10^{-4}	N	N	—	—	8	—	50	10	—	—	—	—
10^{-5}	N	N	—	—	2	—	7	3	—	—	—	—
10^{-6}	N	N	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
10^{-7}	>200	>100	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
10^{-8}	180	80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-9}	110	70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-10}	100	60	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—

Note: A = Abundant; N = Numerous; + = Positive.

in number of stools. Faecal flora generally increased. Gram negatives and namely E. coli increased, Enterococci slightly increased, non lactose fermenters and Anaerobes vanished. Fungi did not grow.

4. Tz. Al., 50 y. old lady (Tables 3, 7). Chronic hepatitis. Carrier of endamoeba histolytica cysts. Paromomycin 1,5 gm for 7 days caused no change in number of stools. Endamoeba cysts disappeared. Gram stained smears showed a relative increase of Gram negatives, slight increase of Gram pos. bacilli, decrease of Entero-

Table 8

Quantitative determination on faecal flora before and after administration of paromomycin

Case V

Dilutions	Before treatment				After treatment			
	Escherichia Coli	Strept. fecalis	Anaerobes	Yeasts	Escherichia Coli	Strept. fecalis	Anaerobes	Yeasts
10^{-1}	N	—	N	++	—	A	—	++
10^{-2}	N	—	N	—	—	A	—	++
10^{-3}	N	—	N	—	—	4	—	—
10^{-4}	72	—	17	—	—	1	—	—
10^{-5}	10	—	6	—	—	—	—	—
10^{-6}	4	—	1	—	—	—	—	—
10^{-7}	1	—	—	—	—	—	—	—
10^{-8}	1	—	—	—	—	—	—	—
10^{-9}	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-10}	—	—	—	—	—	—	—	—

Note: A = Abundant; N = Numerous; + = Positive.

Table 9

Quantitative determination on faecal flora before and after administration of paromomycin

Case VI

Dilutions	Before treatment					After treatment				
	Escherichia Coli	Klebsiella	Strept. fecalis	Anaerobes	Yeasts	Escherichia Coli	Klebsiella	Strept. fecalis	Anaerobes	Yeasts
10^{-1}	N	—	—	+	++	—	N	N	—	++
10^{-2}	N	—	—	8	++	2	50	80	—	++
10^{-3}	N	—	—	5	—	—	10	70	—	—
10^{-4}	72	—	—	1	—	—	1	6	—	—
10^{-5}	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-6}	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-7}	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-8}	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-9}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-10}	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Note: A = Abundant; N = Numerous; + = Positive.

cocci and disappearance of Anaerobes. Quantitative cultures showed a decrease of faecal flora generally and especially of E. coli, vanishment of non lactose fermenters and appearance of Klebsiella.

5. So. E., 45 y. old man (Tables 3, 8). Lung cancer. Paromomycin did not cause any change in number of stools. Intestinal flora deeply changed, decrease of total flora. Gram negatives vanished completely, Enterococci grew out abundantly, Anaerobes vanished. Fungi remained unchanged.

6. Kou. B., 28 y. old man (Tables 3, 9). Mediterranean anemia-Oxyouriasis. Normal stool. On the second day of drug administration the number of stools increased, Paromomycin was continued with the result that the number of stools became normal again. Intestinal flora deeply influenced. Gram negatives vanished, Gram positive bacilli increased greatly and Enterococci slightly. Abundant growth of Klebsiella, vanishment of Anaerobes. Appearance of Geotrichum.

A general finding in all cases were the bulky stools, which looked normal in appearance.

Discussion

In our limited number of protozoal colitis cases paromomycin has proved itself a potent antiprotozoal drug. Its activity is directed both to amoebae and giardia lamblia. In most cases its use is accompanied by slight diarrhoea of very loose stools, which either cease despite the continuation of treatment, or they are of no importance. We have been able to treat our cases without serious difficulty. The antiprotozoal effect was observed within a few days of treatment and it was permanent as far as we could check it, except in the severe amoebic dysentery originating in the Tropics whose parasites displayed a great virulence. This type of amoebiasis is not seen in Greece but very rarely. The common chronic intestinal type responds easily and quickly.

Our observations on the intestinal flora after the use of paromomycin are interesting from many points of view. It is evident that the response of the faecal flora to this antibiotic is not uniform. In some people paromomycin depresses slightly, in others greatly, while in others it leaves unaffected or even increases the faecal flora. We have on purpose tested relatively small doses, like the ones used for treatment of amoebiasis, in order to investigate the effect that it might have on the intestinal populations in general and therefore on the function of the bowel. It is hard to draw any generalizations, but in three of the eight individuals with normal flora (Group A, Table 1) the depression concerned the Gram negatives, while in the other five, who did not show any flora depression the Gram negatives increased relatively. One common observation in all groups is that the non lactose fermenters decreased greatly or vanished after paromomycin treatment.

Enterococci in some cases increased, while in others they decreased. In the majority they seemed to be favorably influenced by the administration of the antibiotic. This is more clear in the six cases with normal stools, on which more detailed quantitative examinations were performed. In only one of the six cases (No. 4) did the enterococci vanish. In all others they have increased in numbers.

Anaerobes usually decreased or vanished.

One interesting feature is that in the people with normal stools the observed change of faecal flora did not result in intestinal disfunction, while in others with an already existing colitis the change was followed by diarrhoeas. This was very clear in the No. 1 and No. 4 cases of group B, (Table 2) who had both a great depression of the faecal flora after paromomycin. The dose that they received was small (1,5 gm daily), but in the first case (ulcerative colitis) the depression of the bacterial population was of such an extent that the stools became almost sterile, except a few pseudomonas colonies, which appeared after treatment. It is hard to ascribe the deterioration of this case to the paucity of the faecal flora, but this is quite likely, since the increase of the flora which followed the use of the milder antiseptic was accompanied by clinical improvement. It might well be a mere pharmacological effect of the antibiotic on an already inflamed intestinal mucosa, as it is the case in an ulcerative colitis. In the other case (No. 4) of the same group there was also a great decrease of the bacterial population, which first concerned more the enterococci, but then almost all bacteria. The diarrhoea apparently was due to this effect.

Interestingly enough the second ulcerative colitis case (No. 2 of group B) improved after the use of the small doses of paromomycin. The flora depression was not great, but it concerned more the Gram negatives and mainly the E. coli, while the enterococci were increased in a great measure. It is true that this case had a milder form of the disease.

Staphylococci did not substitute for the other flora as it usually happens with other antibiotics. Neither did fungi grow in considerable numbers after the small doses that we have used.

The three case of colitis (of the group B) improved after paromomycin treatment. This coincides with an increase and not a decrease of the intestinal flora. This increase concerned E. coli and other Gram negative flora.

The effect of higher doses on the hepatic comata cases was not uniform. In the first case that received the greater amount, an increase in bacterial population was observed and not a decrease, as it was expected and reported by other investigators. Perhaps a higher dose was needed. The second hepatic coma case, on the contrary, had a depression of the bacterial flora with a small dose.

One is hard to draw any conclusions from the above mentioned observations, but it seems clear that the intestinal flora of different individuals, including healthy persons and colitis cases, is responding differently. In some cases we have a great decrease of the bacterial population with a small dose, while in others the same dose causes an

increase of the total flora, which is due to a relative preponderance of one part over the other of the original flora. This apparently has to do with the sensitivities of the individual bacterial strains, but also with the very important interactions of the bowel inhabitants on each other. This interaction is of such a nature that it escapes our predictions thus far.

Another conclusion is that a great depression of the intestinal flora is always accompanied by functional anomalies of the intestine, while an increase of the flora is in general compatible with a normal function, provided that it concerns all the members of the normal inhabitants. A proportional increase of enterococci and gram positive bacilli is usually not associated with diarrhoea.

Summary

The effect of paromomycin on the intestinal flora of protozoal colitis, common colitis and healthy individuals has been studied by gross and finer quantitative technique.

Paromomycin proved effective in eradicating endamoeba histolytica and giardia lamblia from the stools, as well as in curing the patients of their illness.

Untoward effects consisted in loose stools, which did not necessitate interruption of the treatment.

Intestinal flora was not uniformly influenced by this potent antibiotic. In some cases it caused with small doses (1,5 gm daily) a deep change with an almost complete eradication of the flora. In others it did not influence the flora but slightly or the flora was generally increased. This was also observed in a case of hepatic coma when higher doses were given.

Therefore it is hard to make any generalizations and predictions as to the eventual effect on the faecal flora of the doses used for the therapy of protozoal colitis.

These findings should be taken into consideration when paromomycin is decided to be used for common colitis of no specific etiology.

Paromomycin proves to be a very potent depressor of the intestinal flora, especially when this is already poor, and this might have detrimental effects on the patient. It should be used very carefully. It does not seem to be of any benefit in ulcerative colitis, which might deteriorate after use of even small doses of paromomycin.

Bibliography

[1] Courtney, K. O., P. E. Thompson, R. Hodgkinson and J. R. Fitzsimmons: Paromomycin as a therapeutic substance for intestinal amebiasis and bacterial enteritis. Antibiot. Ann. **1959—1960**, 304—309.

[2] Fisher, M. W., M. C. Manning, L. A. Gagliari, M. R. Gaetz and A. L. Erlandson: Paromomycin: Experimental antibacterial activity. Antibiot. Ann. **1959—1960**, 293—303.

[3] Gabuzda, G. J., T. M. Gocke, G. G. Jackson, M. E. Grigsby, Ben Del Love jr. and M. Finland: Some effects of antibiotics on nutrition in man, including studies of the bacterial flora of the feces. A.M.A. Arch. intern. Med. **476**, 101 (1958).

[4] Haenel, H.: Aspekte der Mikronlogischen Beziehungen des Makroorganismus. Mikroorganismen im menschlichen und tierischen Darm und in anderen Organen des Menschen. Zbl. Bakt. **176** (1960).

[5] Papavassiliou, J.: The bacteriological examination of water with filter membranes. Method for search of Cl. Perfrigens in water. Acta microbiol. hellen. **19**, 133 (1956).

[6] Petuely, F., u. G. Lindner: Kritische Untersuchungen über die Darmflora. I. Mitteilung: Die Verschiebung der Keimrelation im gramgefärbten Ausstrich. Zbl. Bakt. **177**, 332 (1960).

[7] Malamos, B., G. K. Daikos, P. Kontomichalou and E. Pinetidou: Faecal flora in protozoal and common colitis. Changes after therapeutic use of intestinal antiseptics. II. AI 307 (Intestopan), Chemotherapia, on the press.

Professor Dr. B. Malamos,
Department of Clinical Therapeutics of the Athens University Medical School at the Alexandra Hospital, Vass. Sofias/K. Louroustr., Athen/Griechenland

Zeitschrift f. Hygiene 148, 256—268 (1962)

Aus dem Max Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

Herstellung von Virusvaccinen mit Hydroxylamin

Verlauf der Inaktivierung und Wirkung des Hydroxylamins auf verschiedene biologische Eigenschaften einiger Viren

Von

WERNER SCHÄFER und RUDOLF ROTT

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Dezember 1961)

Im Zuge der Entwicklung der Poliomyelitis-Vaccine konzentrierte sich das Interesse wieder stärker auf die Verfahren zur Inaktivierung der Viren. Unter anderem wurde versucht, das bisher zumeist verwendete Formaldehyd durch besser geeignete Inaktivierungsmittel zu ersetzen.

Wie neuere Untersuchungen gezeigt haben, ist die Nucleinsäure des Virus der für seine Vermehrung wesentliche Bestandteil. Von unserer Arbeitsgruppe wurden deshalb in erster Linie solche Verbindungen geprüft, die vor allem an dieser Komponente angreifen. Auf Grund der Untersuchungsergebnisse von SCHUSTER u. SCHRAMM (1958) bot sich zunächst die salpetrige Säure an, die — wie die genannten Autoren zeigen konnten — die Aminobasen der Nucleinsäuren desaminiert. Eine eingehendere Prüfung der Wirkung von HNO_2 auf verschiedene Virusarten ergab dann aber, daß bei längerer Einwirkung dieser Verbindung auch die im Proteinanteil enthaltene antigene Struktur Schaden leidet [RESTLE et al.; ROTT u. SCHÄFER (b)]. Für die Herstellung von Poliomyelitis-Vaccinen kommt deshalb die salpetrige Säure nicht in Frage.

Im Verlauf weiterer Untersuchungen zeigte sich dann, daß Hydroxylamin Ribonucleinsäure tiefgreifend verändert [SCHUSTER (1961)]. Wie SCHUSTER nachweisen konnte, wird dadurch Uridin in Ribosyl-Harnstoff und 5-Isoxazolon gespalten; Cytidin lagert dagegen Hydroxylamin an, ohne daß es hier zu einer Spaltung des Pyrimidinringes kommt.

Obwohl NH_2OH bei den Bakteriophagen durch Spaltung von Thioester-Bindungen auch Veränderungen im Schwanzprotein setzt [KOZLOFF et al. (1957)], schien es bei tierpathogenen Virusarten nach einigen von unserer Arbeitsgruppe [FRANKLIN u. WECKER (1959)] durchgeführten Versuchen keine Schädigung der antigenen Struktur herbeizuführen. Es fiel aber auf, daß es menschen- und tierpathogene Virusarten selektiv inaktiviert. Nach FRANKLIN u. WECKER werden wohl das ME[1]- und Western-Equine-Encephalomyelitis-Virus sowie die Viren der Influenzagruppe,

nicht aber das Newcastle Disease- und Mumps-Virus, die ebenso wie die Influenza-Viren zur Myxogruppe gehören, inaktiviert. Soweit wir bisher unterrichtet sind, enthalten sämtliche bisher genannten Virusarten ausschließlich Nucleinsäure vom Ribosetyp. Von den DNS-haltigen Viren wurde das Herpes simplex-Virus geprüft. Es wurde ebenfalls durch NH_2OH nicht inaktiviert.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in welcher Weise die Inaktivierung bei verschiedenen NH_2OH-empfindlichen, menschen- und tierpathogenen Virusarten verläuft und inwieweit neben der Infektiosität noch die übrigen biologischen Aktivitäten dieser Virusarten durch NH_2OH verändert werden. Unser besonderes Interesse galt dabei der antigenen Aktivität.

Material und Methoden

Die bei unseren Versuchen verwendeten Methoden und Materialien wurden größtenteils schon in früheren Veröffentlichungen beschrieben, auf die in diesem Zusammenhang verwiesen sei; dies gilt vor allem für die Hämagglutinations (HA)-, Infektiositäts- und Komplementbindungs-Teste sowie für die Ermittlung der immunogenen Aktivität [Rott u. Schäfer (b)].

1. Virusstämme. *a) Klassische Geflügelpest (KP)-Ei.* 62. Eipassage des Stammes „Rostock". Das Virus wurde aus infizierter Eiflüssigkeit durch fraktioniertes Zentrifugieren in weitgehend reiner Form gewonnen.

b) KP-Maus. Gleicher Ausgangsstamm wie a); 126mal in Mäusegehirnen passagiert.

c) Influenza-Ei. 61.—64. Eipassage des FM1-Stammes. Reinigung wie a).

d) Influenza-Maus. Gleicher Ausgangsstamm wie c); 74mal in Mäuselungen passagiert.

e) Newcastle Disease Virus (NDV). 75. Eipassage des Stammes „Italien". Reinigung durch fraktioniertes Zentrifugieren.

f) ME-Virus[1]. In Mäusegehirnen passagiert. Reinigung durch dreimaliges Behandeln mit „Arcton 63" (Franklin et al. 1959).

2. Infektiositätsteste. Die Infektiosität wurde beim ME-,ND-und KP-Virus mit Hilfe des Plaque-Testes ermittelt (Schäfer et al. 1959), beim KP-Virus kam daneben der Eitest, beim Influenza-Virus ausschließlich der Eitest zur Anwendung.

3. Behandlung mit Hydroxylamin. Gleiche Teile von Virusmaterial und NH_2OH wurden gemischt und bei 20°C gehalten. Pro Zeitwert wurden bestimmte Mengen des Ansatzes entnommen, 1:10 mit eiskalter, gepufferter NaCl-Lösung verdünnt und anschließend gegen große Mengen dieser Lösung 24 Std bei 4°C dialysiert. Als 0-Werte dienten Proben, die sofort nach dem Zusetzen des Hydroxylamins wie oben beschrieben verdünnt und dialysiert wurden.

4. Herstellung von Vaccinen. Vaccinen wurden nur vom Influenza- und KP-Virus hergestellt. Als Kontrollen dienten Formolvaccinen [nähere Angaben siehe Rott u. Schäfer (b)].

[1] ME-Virus = Maus-Elberfeld-Virus; ein Vertreter der Columbia SK-Gruppe.

Bei der Herstellung der NH_2OH-Vaccine wurde in folgender Weise vorgegangen: Es wurde zunächst zu einer 4 molaren Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid ein gleiches Volumen einer 14%igen NaOH-Lösung hinzugefügt und auf diese Weise ein p_H von etwa 7 eingestellt. Diese Lösung wurde mit gleichen Teilen Viruskonzentrat gemischt, das Gemisch 4 Tage unter ständigem Schütteln bei 20° C gehalten und schließlich gegen große Mengen gepufferter NaCl-Lösung in der Kälte dialysiert.

5. Unschädlichkeitsprüfungen. Die Prüfung auf Unschädlichkeit erfolgte bei den *Influenza-Vaccinen* an Eiern und Mäusen in der früher angegebenen Weise [ROTT u. SCHÄFER (b)].

Die konzentrierten *KP-Vaccinen* wurden jeweils an fünf embryonierte Hühnereier und sieben etwa 6 Wochen alte Hühner verimpft. Bei den Eiern wurden 0,1 cm^3 in die Allantoishöhle, bei den Hühnern 1,0 cm^3 in den Brustmuskel injiziert. Außerdem wurden in einem Versuch, in dem Influenza- und KP-Viruskonzentrate 4 und 8 Tage mit 0,2 m Hydroxylamin bei p_H 8,3 behandelt waren, jeweils 50 Eier mit je 0,2 cm^3 beimpft.

In keinem Falle konnten infektiöse Einheiten nachgewiesen werden.

6. Immunisierungsteste. Für die Teste wurden bei den Influenza-Vaccinen wiederum Mäuse [vgl. ROTT u. SCHÄFER (b)], bei den KP-Vaccinen 5—6 Wochen alte, weiße Leghornhühner verwendet.

Die KP-Vaccinen wurden nach Potenzen von 4 verdünnt und mit jeder Verdünnung fünf Hühner i.m. geimpft (Impfdosis: 1 cm^3). 15 Tage nach der Impfung erfolgte die Testinfektion mit $10^{6,9} LD_{50}$ (Eitest). Das Testvirus wurde vorher zweimal in Hühnern passagiert. 11 Tage nach der Testinfektion wurde der Versuch abgeschlossen. Als Kontrollen wurden fünf nicht-immunisierte Hühner zusammen mit den geimpften Tieren im gleichen Raum gehalten und mit diesen infiziert.

Ergebnisse

1. Inaktivierungskinetik. *a) ME-Virus.* Die Inaktivierung des ME-Virus erfolgte in Gegenwart von Phosphatpuffer (p_H 7,0), dessen Endkonzentration 0,02 m betrug. Das verwendete Hydroxylamin wurde durch NaOH auf p_H 7 eingestellt.

Um den Einfluß der Hydroxylaminkonzentration auf den Inaktivierungsverlauf zu prüfen, wurden Versuche mit 0,1 und 0,5 m NH_2OH durchgeführt. Wie Abb. 1 ausweist, verlief die Inaktivierungskurve in beiden Fällen exponentiell. Bei dem Ansatz mit 0,1 m NH_2OH wurde sie über $\sim 10^3$ PBE[1], beim Ansatz mit 0,5 m NH_2OH über annähernd 10^6 PBE verfolgt. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit nahm — wie ein Vergleich der beiden Kurven miteinander zeigt — nahezu proportional mit der Hydroxylamin-Konzentration zu.

b) KP-Virus. Eine analoge Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit von der Konzentration des Hydroxylamins wurde auch beim KP-Virus unter Bedingungen gefunden, die den beim ME-Virus eingehaltenen entsprachen.

[1] PBE = Plaque-bildende Einheiten.

Beim KP-Virus wurde darüber hinaus noch der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf den Verlauf der Inaktivierung untersucht; p_H 7,0 wurde dabei durch Phosphatpuffer (0,02 m), p_H 9,0 durch 0,1 m Ammoniak-Ammonchloridpuffer eingestellt. Deutliche Unterschiede im Inaktivierungsverhalten ergaben sich unter diesen Bedingungen nicht

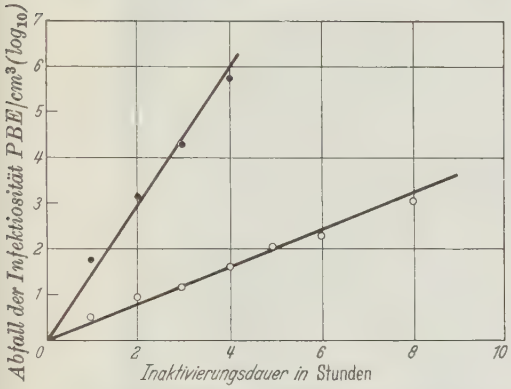


Abb. 1. Inaktivierung des ME-Virus durch 0,1 m und 0,5 m NH_2OH bei p_H 7,0. o——o 0,1 m NH_2OH; •——• 0,5 m NH_2OH

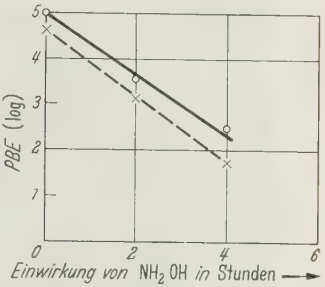


Abb. 2. Inaktivierung des KP-Virus durch 0,2 m NH_2OH bei p_H 7 und 9. o——o p_H 7,0; ×——× p_H 9,0

(siehe Abb. 2). Die Untersuchungen erstreckten sich allerdings nur über $\sim 10^3$ PBE.

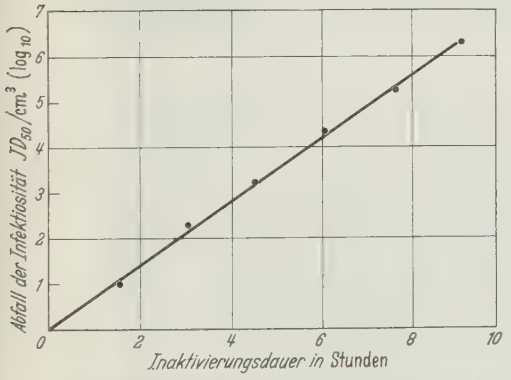


Abb. 3. Inaktivierung des KP-Virus durch 0,2 m NH_2OH bei p_H 8,3

Eine weiter reichende Untersuchung der Inaktivierungskinetik wurde bei p_H 8,3 (0,1 m Ammoniak-Ammonchloridpuffer) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurde der Abfall über etwa 7 $\log_{10}$ Einheiten verfolgt. Die Hydroxylamin-Konzentration im Ansatz war 0,2molar. Ebenso wie bei dem relativ einfach aufgebauten ME-Virus wurde auch bei dem wesentlich komplexer beschaffenen KP-Virus ein exponentieller Abfall der Infektiosität ermittelt, wenn die Austestung des Untersuchungsmaterials in bebrüteten Hühnereiern erfolgte (Abb. 3).

Ein eigenartiges Phänomen wurde beobachtet, wenn der Plaquetest herangezogen wurde. In unseren Versuchen wurde er parallel mit dem Eitest durchgeführt. Wurde das relativ hochkonzentrierte Virusmaterial (Versuch 1: $10^{8,74}$ PBE/cm³; Versuch 2: $10^{8,61}$ PBE/cm³) nach Behandeln mit NH_2OH auf die Gewebekultur verimpft, so wurde von

Tabelle 1. *Infektiosität des NH_2OH-behandelten KP-Virus ermittelt im Plaque-Test*

Versuch		Einwirkung 0,2 m NH_2OH in Std	Verdünnung 10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
	Verimpfte Viruspartikeln pro Platte (ausgedrückt in ursprünglichen PBE)		$1{,}1 \cdot 10^7$	$1{,}1 \cdot 10^6$	$1{,}1 \cdot 10^5$	$1{,}1 \cdot 10^4$	$1{,}1 \cdot 10^3$	$1{,}1 \cdot 10^2$	$1{,}1 \cdot 10$	1,1
1	Tatsächliche Anzahl an Plaques/Platte	0					+	110*	18	3
		1,5			+	+	35	4	0	0
		3	+	+	+	64	2	0	0	
		6	+	+	48	0	0			
		7,5	+	159	3	0				
		9	251	4	0					
	Verimpfte Viruspartikeln pro Platte (ausgedrückt in ursprünglichen PBE)		$8{,}2 \cdot 10^6$	$8{,}2 \cdot 10^5$	$8{,}2 \cdot 10^4$	$8{,}2 \cdot 10^3$	$8{,}2 \cdot 10^2$	$8{,}2 \cdot 10$	8,2	0,82
2	Tatsächliche Anzahl an Plaques/Platte	0				+	+	82	7	0,2
		1,5		+	+	105	11	0,2	0	
		3	+	+	40	0	0	0		
		4,5	+	111	1	0	0	0		
		6	227	0,7	0	0	0			

+ = konfluierende Plaques. * Mittelwerte aus drei Platten/Verdünnung.

bestimmten Verdünnungsstufen ab nicht mehr die üblicherweise beobachtete Relation zwischen Verdünnungsfaktor und Zahl der entstandenen

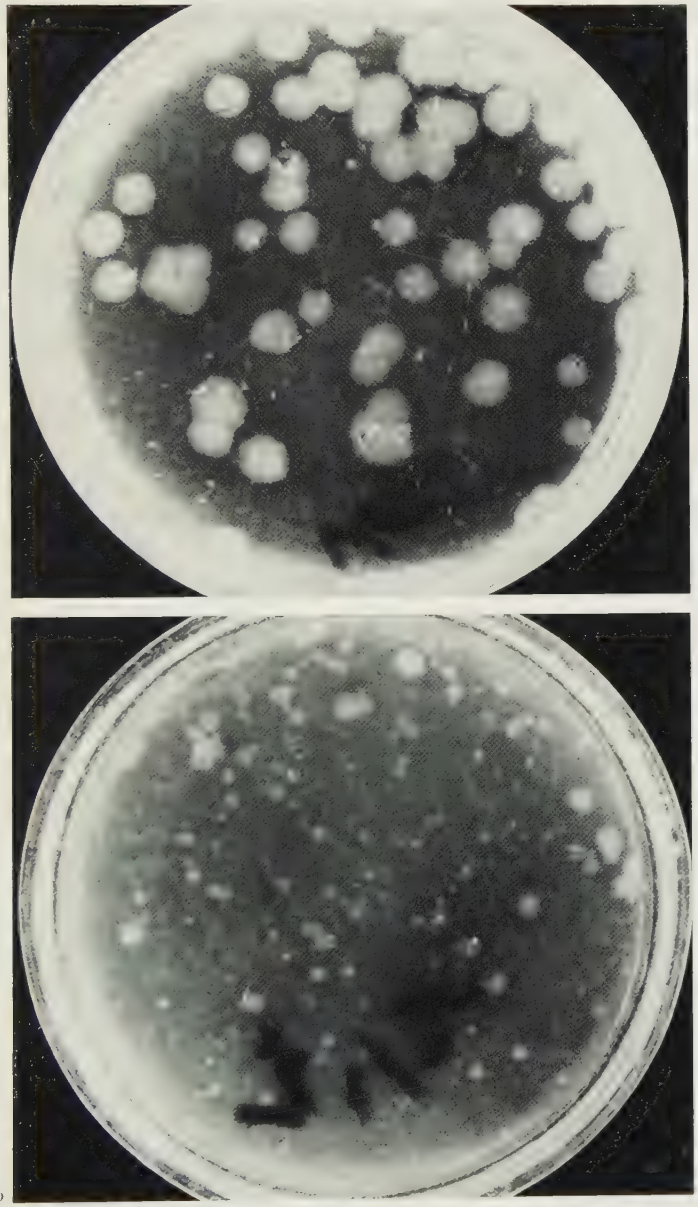


Abb. 4. Plaque-Veränderungen beim KP-Virus nach Behandeln mit 0,2 m NH_2OH. a nicht behandelte Kontrolle; b $7^1/_2$ Std NH_2OH behandelt (0,2 m, p_H 8,3)

Plaques gefunden. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, waren z. B. in Versuch 2 bei dem 6 Std mit NH_2OH behandelten Material bei der Verdünnung 10^{-1} 227 Plaques, bei der Verdünnung 10^{-2} aber nur 0,7 Plaques entstanden. In den Kulturen, in denen mehr Plaques, als zu erwarten waren, auftraten, unterschieden sich diese in der überwiegenden Mehrzahl auch in Größe und Form von den normalerweise beim KP-Virus beobachteten (siehe Abb. 4). Sie waren durchschnittlich kleiner und zumeist nicht rund, sondern unregelmäßig geformt. Die kritische Dosis, bei der das beschriebene Phänomen auftrat, entsprach bei den beiden in Tab. 1 zusammengefaßten Versuchen einer Menge von 10^5 bis 10^6 ursprünglich vorhandenen PBE.

Bei den vorher geschilderten Versuchen über die Abhängigkeit der Inaktivierungsrate von der Hydroxylamin- bzw. Wasserstoffionenkonzentration, bei denen ebenfalls der Plaquetest verwendet wurde, lag die Viruskonzentration unter der angegebenen kritischen Dosis. Hier kam deshalb das beschriebene Phänomen auch nicht zur Beobachtung.

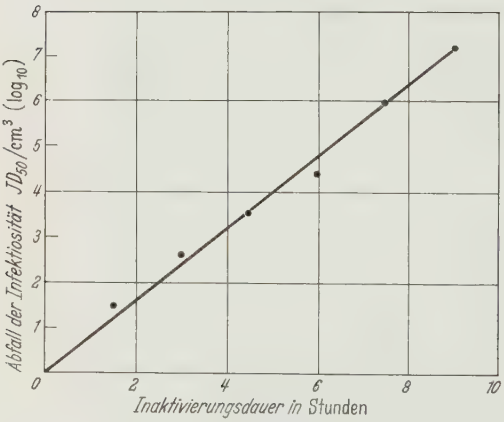


Abb. 5. Inaktivierung des Influenza-Virus durch 0,2 m NH_2OH, p_H 7,0

c) Influenza-Virus. Beim Influenza-Virus wurde, da für den verwendeten Stamm kein geeigneter Plaquetest zur Verfügung stand, die Inaktivierungskinetik ausschließlich im Eitest verfolgt. Die Versuchsanordnung war hier folgende: 0,02 m Phosphatpuffer, p_H 7,0; 0,2 m Hydroxylamin.

Wie das in Abb. 5 zusammengefaßte Versuchsergebnis erkennen läßt, folgte auch bei diesem Virus die Inaktivierung über einen Bereich von mindestens 7 log-Einheiten einer Reaktion Erster Ordnung. Die Inaktivierungsrate entspricht etwa derjenigen des ihm nahe verwandten KP-Virus (vgl. Abb. 3).

d) Newcastle Disease-Virus. Wie bereits eingangs erwähnt, konnten FRANKLIN u. WECKER in einem Stichversuch zeigen, daß das NDV im Gegensatz zu den Viren der Influenzagruppe durch NH_2OH nicht inaktiviert wird. Die genannten Autoren führten ihren Versuch bei p_H 7,0 durch. Inzwischen fand nun SCHUSTER, daß im leicht sauren Milieu (p_H 6) in erster Linie Cytidin, im alkalischen (p_H 9,0) vor allem Uridin mit NH_2OH reagiert. Diese Feststellung veranlaßte uns, einmal nach-

zuprüfen, ob durch Änderung des p_H-Wertes nicht doch noch eine Inaktivierung des NDV durch NH_2OH erreicht werden kann.

Das NDV wurde in Gegenwart von 0,2 m NH_2OH bei p_H 7,5 und 9 10 Std lang bei 20° C inkubiert. p_H 5 wurde durch Acetat-, p_H 7 durch Phosphat- und p_H 9 durch Ammoniak-Ammonchloridpuffer eingestellt. Die Pufferkonzentration lag in jedem Falle bei 0,1 molar.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tab. 2 enthalten. Wie man aus ihr entnehmen kann, wurde in keinem Falle eine signifikante Abnahme der infektiösen Einheiten durch die NH_2OH-Einwirkung festgestellt.

Tabelle 2. *Einfluß von NH_2OH auf die Infektiosität des NDV bei verschiedenen p_H-Werten*

p_H	Material	Inkubation bei 20 °C in Std	PBE/cm³ (log_{10})
	Kontrolle	0	7,35
5,0	Kontrolle	10	7,19
	NH_2OH	10	7,31
	Kontrolle	0	6,85
7,0	Kontrolle	10	6,55
	NH_2OH	10	5,95
	Kontrolle	0	6,94
9,0	Kontrolle	10	6,60
	NH_2OH	10	6,34

Tabelle 3. *Hämagglutinierende und enzymatische Aktivitäten von KP- und Influenza-Viruspräparaten nach Behandeln mit 0,2 m NH_2OH bei p_H 8,3*

Virus	Einwirkung von NH_2OH bei 20 °C in Tagen	HA-E/cm³	Enzym-E/cm³
KP	4	8400	192
	8	8400	206
	ohne NH_2OH		
	8	8400	126
Influenza (FM1)	4	4200	— *
	8	4200	— *
	ohne NH_2OH		
	8	4200	— *

* Nicht bestimmt.

2. Verhalten der hämagglutinierenden, enzymatischen und antigenen Aktivität. Bei den Versuchen mit HNO_2 fand die hier auftretende Schädigung der Proteinhülle des Virus seinen Ausdruck im Abfall der hämagglutinierenden, enzymatischen (Neuraminidase) und antigenen Aktivität [Rott u. Schäferb)]. Es wurde deshalb geprüft, wie sich die entsprechenden Aktivitäten unter dem Einfluß des NH_2OH verhalten. Die Untersuchungen wurden mit dem KP- und Influenza-Virus durchgeführt. Um einen zu hohen Aufwand zu vermeiden, wurden die Inaktivierungsbedingungen von vornherein sehr scharf gewählt.

Das KP-Virus wurde in einem Versuch mit 0,2 m NH_2OH bei p_H 8,3 4 und 8 Tage, in einem anderen mit 1 m NH_2OH (p_H 7) 4 Tage bei 20° C inkubiert. Beim Influenza-Virus erfolgte die Inaktivierung mit 1 m NH_2OH bei p_H 7 (20° C, 4 Tage). Als Kontrollen dienten nicht-behandelte Viruspräparate bzw. solche, die durch Formaldehyd inaktiviert wurden.

Die Ergebnisse der *Hämagglutinin-* und *Enzymbestimmungen* sind in Tab. 3, die der *Komplementbindungsteste* in Abb. 6 zusammengefaßt. Sie lassen erkennen, daß keine der betreffenden Aktivitäten durch die angewendete intensive NH_2OH-Behandlung, nach der selbst in relativ

großen Stichproben keine infektiösen Teilchen mehr nachzuweisen waren (siehe Material und Methoden), geschädigt wurde.

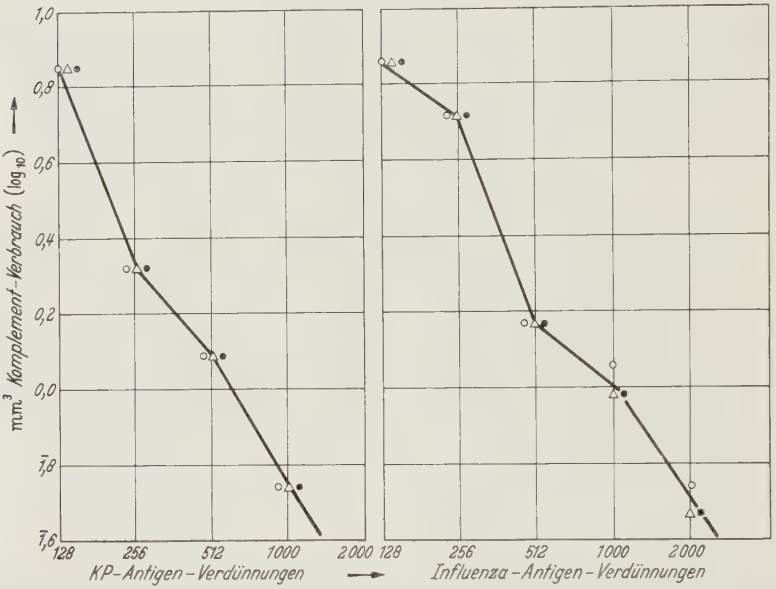


Abb. 6. Komplementbindende Aktivitäten der KP- und Influenza (FM 1)-Vaccinen. 1,0 m NH_2OH, p_H 7,0, 4 Tage bei 20° C, bzw. 0,018% Formaldehyd, p_H 7,0, 2 Tage bei 20° C. o———o nicht behandelte Kontrollen; •———• Formol-Vaccinen; △———△ NH_2OH-Vaccinen. Bei den Antigenverdünnungen sind die reziproken Werte angegeben

Kontrollen:	1	1	1	1	1

Verdünnung der Vaccine	Formaldehyd ($MSD_{50}=10^{-2,93}$)					Hydroxylamin ($MSD_{50}=10^{-2,87}$)				
1/64										
1/256	4									
1/1024	3	4	4	5		4	5	5	5	
1/4096	2	3	4			3	3	4	4	
1/16384	1	2	2	3	4	1	1	1	1	2

Abb. 7. Immunisierungsversuch mit KP-Vaccinen bei Hühnern. 1,0 m Hydroxylamin, p_H 7,0, 4 Tage bei 20° C, bzw. 0,018% Formaldehyd, p_H 7,0, 2 Tage bei 20° C. HA-E/cm³ Vaccine: 32500; ID_{50}/cm³ Vaccine $10^{11,5}$; Virus-N/cm³ Vaccine : 0,33 mg. Jedes Quadrat versinnbildlicht ein Huhn. Die Zahlen geben an, am wievielten Tage nach der Testinfektion die Tiere verendeten. MSD_{50} = minimale schützende Dosis (50%)

Auch die *Immunisierungsversuche* lieferten keinen Hinweis dafür, daß tiefer greifende Veränderungen der Oberflächenstruktur der Virus-

partikeln durch NH_2OH entstehen. Aus den in Abb. 7 und 8 wiedergegebenen Ergebnissen gewinnt man vielmehr den Eindruck, daß die mit Hilfe von NH_2OH (1 m NH_2OH, 4 Tage, 20° C) hergestellten Vaccinen, verglichen mit den als Kontrollen dienenden Formolvaccinen, eine etwas bessere Schutzwirkung zeigten.

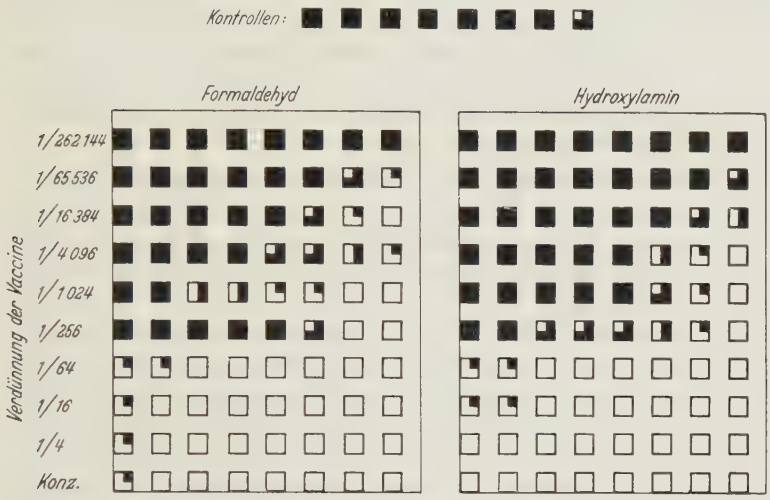


Abb. 8. Immunisierungsversuch mit Influenza-Vaccinen bei Mäusen. Inaktivierung wie Versuch Abb. 7. HA-E/cm³ Vaccine: 65000; ID_{50}/cm³ Vaccine: $10^{11,7}$; Virus-N/cm³ Vaccine : 0,45 mg. Jedes Quadrat versinnbildlicht eine Maus. ■ Maus gestorben, ◪ ◨ ◩ verschiedene Grade der Lungenveränderungen, □ keine makroskopisch feststellbaren Lungenveränderungen

Besprechung der Ergebnisse

Wie die beschriebenen Untersuchungen ergaben, lassen sich das ME-, das KP- und Influenza-Virus durch NH_2OH inaktivieren. Die Inaktivierung folgt dem Verlauf einer Reaktion Erster Ordnung. Dieser Verlauf ließ sich bei den Viren der Influenzagruppe allerdings nur dann erkennen, wenn man die Infektiosität in embryonierten Hühnereiern austestete.

Bei Verwendung des Plaque-Testes wurde beim KP-Virus ein Phänomen beobachtet, das eine sinnvolle Auswertung der Versuchsergebnisse unmöglich machte. Das NH_2OH-behandelte Virusmaterial ergab hier, wenn es in bestimmten Konzentrationen auf die Zellschichten gegeben wurde, eine Anzahl von Plaque-bildenden Einheiten, die 5 –30mal höher war, als man nach der Zahl der in der nächsthöheren Verdünnung auftretenden Plaques erwarten durfte. Im Gegensatz zum Verhalten des unbehandelten KP-Virus nahm also in den entsprechenden Bereichen die Zahl der PBE nicht proportional mit der Verdünnung ab. Außerdem unterschieden sich die dabei entstehenden Plaques auch noch in ihrer Größe und Form von den normalen Plaques des KP-Virus. In zwei in dieser Richtung durchgeführten Versuchen traten diese Änderungen auf,

wenn die Menge des auf die Kulturen gebrachten NH_2OH-behandelten Virusmaterials etwa 10^5 bis 10^6 ursprünglich vorhandenen PBE entsprach.

Durch die Einwirkung von freiem NH_2OH auf die Wirtszellen kann dieses Phänomen kaum hervorgerufen sein, da das Material vor dem Verimpfen ausgiebig gegen NH_2OH-freien Puffer dialysiert wurde. Nach unseren bisherigen Feststellungen ist es wahrscheinlicher, daß die Anzahl der auf die einzelne Zelle entfallenden NH_2OH-behandelten Viruspartikeln dabei eine Rolle spielt. Die kritische Zahl von 10^5 bis 10^6 PBE entspricht etwa 10^6 bis 10^7 Viruspartikeln oder bei der verwendeten Kultur im Durchschnitt mehr als einem Virusteilchen/Zelle.

Unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse drängt sich die Vermutung auf, daß in der Gewebekultur eine Reaktivierung des Virus durch Mehrfach-„Infektion" mit NH_2OH-behandelten Teilchen erfolgen kann. Wahrscheinlich wird ein solcher Effekt im Eitest dadurch unterdrückt, daß hier mehr Zellen zur Verfügung stehen, und weil hier außerdem das Virusmaterial durch die Eiflüssigkeit zusätzlich verdünnt wird. Man muß allerdings mit der Möglichkeit rechnen, daß die Verhältnisse durch das Auftreten von Mutanten kompliziert werden, zumal beim Tabakmosaik-Virus eine mutagene Wirkung des Hydroxylamins vermutet wird (Schuster). Womöglich beruht das Auftreten von anders geformten Plaques zum Teil hierauf. Es könnte aber auch sein, daß hier ein Interferenz-Effekt hineinspielt. Beobachtungen ähnlicher Art wurden übrigens auch bei Verwendung eines anderen an der Virus-RNS angreifenden Inaktivierungsmittels von Scholtissek et al. gemacht.

Auffallend ist, daß das Phänomen durch NH_2OH nicht bei allen Virusarten hervorgerufen wird. Beim ME-Virus wurde es unter unseren Bedingungen nicht festgestellt. In diesem Zusammenhang könnten einige Ergebnisse anderer Autoren von Bedeutung sein. Aus genetischen Untersuchungen weiß man, daß die Viren der Influenzagruppe, zu denen auch das KP-Virus gehört, relativ häufig rekombinieren, während das Poliomyelitis-Virus, dem das ME-Virus seinem Aufbau nach nahesteht, nur relativ selten Rekombinanten liefert (vgl. Burnet 1959). Außerdem ist bekannt, daß ebenso wie die Bakteriophagen auch die Influenza-Viren eine multiplicity-Reaktivierung zeigen (Henle u. Liu 1951; Barry 1961). Eine endgültige Entscheidung über die Ursachen des beim KP-Virus beobachteten Phänomens kann beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen noch nicht gefällt werden. Experimente zur genaueren Analyse desselben sind zur Zeit im Gange.

Eine bindende Erklärung fehlt auch noch für das eigenartige Verhalten des NDV, das ebenso wie die übrigen untersuchten Viren RNS enthält, im Gegensatz zu diesen aber nicht durch NH_2OH inaktiviert wird, selbst dann nicht, wenn man das p_H erheblich variiert. Ähnlich verhält sich das RNS-haltige TMV (Schuster u. Wittmann). Hier

konnte aber gezeigt werden, daß NH_2OH in der Lage ist, die infektiöse RNS zu inaktivieren, die durch Behandeln mit Phenol aus den Viruspartikeln isoliert wurde. Danach muß man annehmen, daß das genetische Material durch das Virusprotein vor dem Zugriff von NH_2OH geschützt werden kann. In diesem Zusammenhang könnte es von Bedeutung sein, daß die RNS-haltige Innenstruktur des NDV in ihrem Feinbau sehr stark an das TMV erinnert [Rott u. Schäfer (1961a)].

Wenn — wie vorher diskutiert — bei bestimmten Virusarten eine Reaktivierung NH_2OH-behandelter Virusteilchen tatsächlich auftreten kann, bleibt zu überlegen, ob diese Verbindung überhaupt zur Herstellung von Vaccinen geeignet ist. Unsere in Tab. 1 wiedergegebenen Ergebnisse lassen aber vermuten, daß die Wahrscheinlichkeit der Reaktivierung mit fortschreitender Dauer der Einwirkung von Hydroxylamin immer mehr abnimmt. Vermutlich ist das deshalb der Fall, weil sie von der Zahl der Treffer in der Nucleinsäure abhängt. Die erwähnte Schwierigkeit kann man daher auf die Weise überwinden, daß man die betreffenden Virusarten durchgreifender mit NH_2OH behandelt.

Wie unsere weiteren Prüfungen ergaben, wird selbst durch viertägige Einwirkung von 1 m NH_2OH weder die hämagglutinierende, enzymatische und komplementbindende Aktivität noch die immunogene Wirksamkeit der Viren beeinträchtigt. Das so behandelte Material lieferte vielmehr Vaccinen, die den als Kontrollen verwendeten Formolvaccinen zumindest gleichwertig waren. Ein Nachteil des Hydroxylamins gegenüber dem Formaldehyd besteht aber darin, daß mit ihm nicht alle Virusarten inaktiviert werden können.

Von besonderer Bedeutung ist die Frage, wie sich das Poliomyelitis-Virus gegenüber NH_2OH verhält. Nach bisher noch unveröffentlichten Untersuchungen, die von anderer Seite durchgeführt wurden (Restle u. Hennessen), scheint das beschriebene Verfahren auch hier sowohl im Hinblick auf die Inaktivierungskinetik wie auch auf die Erhaltung der Antigenstruktur des Virus erfolgversprechend zu sein.

Zusammenfassung

Durch Hydroxylamin werden das zur Columbia SK-Gruppe gehörende ME-Virus sowie verschiedene Viren der Influenzagruppe (klassische Geflügelpest, Influenza FM 1) dem Verlauf einer Reaktion Erster Ordnung folgend inaktiviert. Im Gegensatz dazu konnte bei dem zur Parainfluenzagruppe gehörenden Newcastle Disease Virus selbst bei relativ niedrigen bzw. hohen p_H-Werten durch NH_2OH eine Inaktivierung nicht erreicht werden.

Beim Virus der klassischen Geflügelpest wurden nach Behandeln mit NH_2OH Unregelmäßigkeiten im Plaque-Test beobachtet, die möglicherweise auf ein Phänomen zurückzuführen sind, das der „multiplicity reactivation" der Bakteriophagen entspricht.

Die Influenza-Viren waren selbst nach sehr durchgreifender Behandlung mit NH_2OH (1 m, 4 Tage bei 20° C) noch im Besitz der vollen hämagglutinierenden, enzymatischen und antigenen Aktivität. Im Immunisierungsversuch zeigten die auf diese Weise hergestellten Vaccinen sogar eine etwas bessere Wirksamkeit als die im Parallelversuch geprüften Formaldehyd-Vaccinen.

Die Möglichkeit der Verwendung von NH_2OH für die Herstellung von Virusimpfstoffen wird diskutiert.

Herrn Dr. H. Schuster danken wir für einige Anregungen, Herrn Dr. H. Restle und Herrn Dr. W. Hennessen, Behring-Werke Marburg, dafür, daß sie uns ihre Ergebnisse vor der Veröffentlichung zugänglich machten, und Fräulein L. Pister für ihre gewissenhafte Mitarbeit.

Literatur

Barry, R. D.: The multiplication of influenza virus. II. Multiplicity reactivation of ultraviolet irradiated virus. Virology **14**, 398 (1961).

Burnet, F. M.: Genetic interactions between animal viruses. In: The Viruses, Vol. 3, pp. 275. New York and London: Academic Press 1959.

Franklin, R. M., and E. Wecker: Inactivation of some animal viruses by hydroxylamine and the structure of ribonucleic acid. Nature (Lond.) **184**, 343 (1959).

Franklin, R. M., E. Wecker and C. Henry: Some properties of an infectious ribonucleic acid from mouse encephalomyelitis virus. Virology **7**, 220 (1959).

Henle, W., and O. C. Liu: Studies on host-virus interactions in the chick embryo-influenza virus system. VI. Evidence for multiplicity reactivation of inactivated virus. J. exp. Med. **94**, 305 (1951).

Kozloff, L. M., M. Lute and K. Henderson: Viral Invasion. I. Rupture of thiolester bonds in the bacteriophage tail. J. biol. Chem. **228**, 511 (1957).

Restle, H., u. W. Hennessen: Persönliche Mitteilung.

Restle, H., W. Hennessen u. W. Schäfer: Verhalten der antigenen und sonstigen biologischen Eigenschaften menschen- und tierpathogener Virusarten beim Behandeln mit salpetriger Säure. I. Mitteilung. Z. Naturforsch. (im Druck).

Rott, R., and W. Schäfer: Fine structure of subunits isolated from Newcastle disease virus (NDV). Virology **14**, 298 (1961a).

Rott, R. u. W. Schäfer: Verhalten der antigenen und sonstigen biologischen Eigenschaften menschen- und tierpathogener Virusarten beim Behandeln mit salpetriger Säure. II. Mitteilung. Z. Naturforsch. (im Druck b).

Schäfer, W., Th. Zimmermann u. H. Schuster: Inaktivierung verschiedener menschen- und tierpathogener Virusarten sowie des Tabakmosaik-Virus durch salpetrige Säure. Z. Naturforsch. **14**b, 632 (1959).

Scholtissek, C., R. Rott u. W. Schäfer: Verhalten einiger Viren gegenüber dem Bayer-Präparat A 139. Z. Naturforsch. (im Druck).

Schuster, H.: The reaction of tobacco mosaic virus ribonucleic acid with hydroxylamine. J. Mol. Biol. **3**, 447 (1961).

Schuster, H., u. G. Schramm: Bestimmung der biologisch wirksamen Einheit in der Ribonucleinsäure des Tabakmosaikvirus auf chemischem Wege. Z. Naturforsch. **13**b, 697 (1958).

Schuster, H., u. H. G. Wittmann: Persönliche Mitteilung.

Prof. Dr. W. Schäfer,
Max Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, Spemannstraße 35

Zeitschrift f. Hygiene 148, 269—281 (1962)

Aus dem Bakteriologischen Laboratorium der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten in Hamburg (Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Schuchardt)

Untersuchungen über die asaccharolytischen Neisserien des menschlichen Nasopharynx

Von

U. Berger und E. Paepcke

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Dezember 1961)

Bei unseren Untersuchungen über die Neisserien der menschlichen Mundhöhle mußten wir die Erfahrung machen, daß im Gegensatz zu den zuckerverwertenden Arten *(N. sicca, N. perflava, N. subflava)* asaccharolytische Stämme ausgesprochen selten sind (Berger u. Wulf). Das erschien umso bedauerlicher, als gerade die Beschreibungen von *N. catarrhalis* so stark auseinandergehen, daß sie eine Revision förmlich herausfordern.

Die von den frühen Autoren (Frosch u. Kolle 1896; Ghon u. Pfeiffer 1902; v. Lingelsheim 1906) beschriebenen Kolonien waren rund und weißlich, ähnlich denen des „Staphylococcus albus", mit matter, später unregelmäßiger Oberfläche; im Verlauf einiger Tage bildeten sich ein erhabenes Zentrum und ein unregelmäßig begrenzter Randsaum aus. Die Kolonien waren auf dem Nährboden im ganzen verschieblich und von trockener „mörtelartiger" Konsistenz. In der Durchsicht bei Lupenvergrößerung erschienen sie gelb-braun und von grober Struktur.

Der von Elser u. Huntoon (1909) daneben beobachtete *zweite Kolonietyp* war kleiner, flach-konvex, grau und semi-opak mit glänzender Oberfläche und glattem Rand. Das Wachstum war gelegentlich etwas schleimig.

Ein *dritter Typ*, über den als einziger Gordon (1921) berichtete, bildete sehr feine Kolonien *(pin point colonies)*, die im mikroskopischen Präparat zahlreiche Riesenformen erkennen ließen.

Nachdem es uns gelungen war, mit Hilfe eines Elektivnährbodens 27 Stämme asaccharolytischer Neisserien aus dem menschlichen Nasopharynx zu züchten (Berger 1961c), wurde die vorliegende Untersuchung durchgeführt mit dem Ziel, etwas mehr über die Eigenschaften dieser Stämme zu erfahren und einige der Divergenzen zu klären, die uns in der Literatur über *N. catarrhalis* begegnen.

Methodik

Stämme. 27 in unserem Laboratorium gezüchtete Stämme; dazu je ein Stamm der National Institutes of Health, Bethesda (Md), und der National Type Culture Collection, London. Die eigenen Stämme tragen die Protokollnummern, die beiden anderen die Bezeichnungen B und E. Für einen Teil der Untersuchungen stand noch ein weiterer Sammlungsstamm (HI) zur Verfügung.

Als *Nährböden* für die Prüfung der Wachstumsansprüche und der Wuchsform wurde Nähragar (Bacto Heart Infusion Agar, Difco), auch mit Zusatz von 7,5% Schafblut, sowie Nährbouillon (Bacto Heart Infusion Broth, Difco) mit 5% Pferdeserum verwandt.

Hämolyse wurde auf Schafblutplatten und in 2%iger Blutbouillon (14 Tage Bebrütung bei 37° C) geprüft. Der Nachweis eines *filtrierbaren Hämolysins* wurde mit sterilen Filtraten 14tägiger Bouillonkulturen gegenüber 5%igen Suspensionen von Schaferythrocyten im Röhrchentest versucht.

Die *Pigmente* wurden mit heißem Methanol extrahiert, einige der Extrakte (B, 101, E, 8, 18, 77, 126, 149, 150) im Beckman Recording Spectrophotometer, Modell DK 1, untersucht (Berger 1961 b)[1].

Säurebildung aus *Glucose*, *Maltose*, *Fructose* und *Saccharose* wurde auf Lingelsheimplatten geprüft.

Zur Nachweistechnik weiterer biochemischer Eigenschaften kann auf frühere Mitteilungen verwiesen werden: *Polysaccharidbildung* aus Saccharose (Berger 1961 a); *Verwertung organischer Säuren* und Acetoinbildung aus Pyruvat (Berger 1962)[2]; *Ammoniakbildung*, Reduktion von *Nitrat* und *Nitrit* (Berger 1961 d); *Katalase* und *Oxydase* (Berger 1960).

Weitere Untersuchungen: *Schwefelwasserstoffbildung* in Pankreatinverdauungsbrühe mit Bleiacetatpapier (5 Tage); *Indol* im gleichen Nährboden (5 Tage) mit dem Reagens von Kovacs u. Hoffmann; *Urease* in 1%iger Harnstoffbouillon (5 Tage) mit Phenolphthalein; *Penicillinresistenz* im Röhrchentest (48 Std).

Für die *serologischen Untersuchungen* wurden mit der Technik von Warner, Faber u. Pelczar Kaninchen-Immunsera gegen die Stämme B, E, 8, 77 und 150 hergestellt und nach Tyndallisieren mit Merthiolat 1:10000 konserviert. Die *Präcipitationen* wurden mit autoklavierten Antigenen im Röhrchentest durchgeführt (30 min).

Ergebnisse

Um die Beschreibung der Ergebnisse nicht unnötig zu komplizieren, sei schon hier bemerkt, daß sich die 30 Stämme in zwei leicht zu unterscheidende Gruppen einteilen ließen: *Gruppe I* umfaßte nur zwei Stämme (B, 101), *Gruppe II* alle übrigen.

Morphologie. Gruppe I: gramnegative, mittelgroße Kokken von regelmäßigem Korn (Abb. 1). — Gruppe II: gramnegative Diplokokken und Tetraden von oft recht unregelmäßigem Korn (Abb. 2).

Kolonien auf Blutagar. Gruppe I: relativ groß, erhaben, rund, weißlich, opak (ähnlich „Staph. albus"); später prominentes Zentrum und unregelmäßiger Randsaum (Abb. 3, 4), manchmal etwas gelblich. Keine nennenswerte Veränderung des Blutnährbodens. Konsistenz butterweich. — Gruppe II: kleiner, flacher, rund, glatt, grau oder graugelblich, semi-opak (ähnlich *N. subflava*) (Abb. 5, 6); auch *pin point colonies*. In der Regel außer Größenzunahme keine Veränderung der

[1] Für die Durchführung der spektrophotometrischen Untersuchungen bin ich Herrn Privatdozent Dr. O. Drees, Institut zur Erforschung der Poliomyelitis, Hamburg, zu besonderem Dank verpflichtet.

[2] Die einzige Modifikation der ursprünglichen Methode bestand in der Beimpfung der Testkölbchen mit 0,1 ml (statt 0,05 ml) Bakteriensuspension.

Koloniemorphologie bei längerer Bebrütung, ausnahmsweise aber ebenfalls zarter Randsaum. Unter dichtem Wachstum grüne Verfärbung der Blutplatte. Konsistenz weich, manchmal etwas trocken.

Wachstum in Serumbouillon. Die meisten Stämme beider Gruppen zeigen ein ausgeprägtes Oberflächenwachstum (Rand und Häutchen); die Bouillon bleibt klar und läßt einen meist körnigen Bodensatz erkennen. Das Oberflächenwachstum kann aber auch fehlen, die Bouillon kann eine leichte Trübung aufweisen, und der Bodensatz kann mehr flockig oder auch fibrinös erscheinen.

Wachstumsansprüche. Bei 37° C auf Nähragar gutes Wachstum aller Stämme. — Bei 22° C zeigt Gruppe I auf Blut- und Nähragar gutes, Gruppe II sehr spärliches Wachstum.

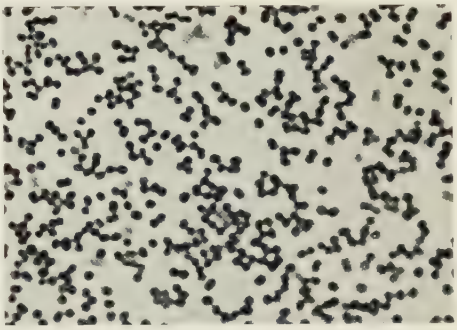


Abb. 1. Neisseria catarrhalis I, Stamm 101 (1200×)

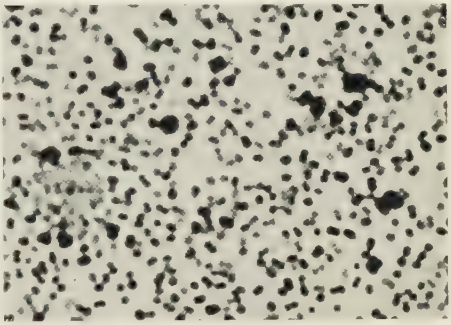


Abb. 2. Neisseria catarrhalis II, Stamm 69 (1200×)

Abb. 3

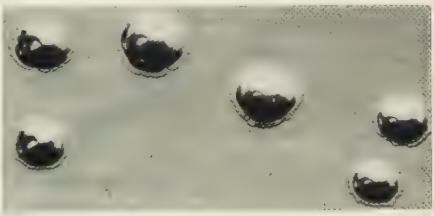


Abb. 4

Abb. 3 und 4. Neisseria catarrhalis I, Stamm 101, auf Blutagar (4×)
Abb. 3. 2 Tage bebrütet
Abb. 4. 5 Tage bebrütet

Hämolyse. Beide Gruppen: keine Plattenhämolyse. In Blutbouillon nach 3—14 Tagen Hämolyse durch Gruppe I und durch die Hälfte der Stämme von Gruppe II. Kein filtrierbares Hämotoxin nachweisbar.

Pigment. Gruppe I: keine Pigmentbildung; Methanolextrakt zeigt im Spektrophotometer einen Gipfel bei 400 mμ oder eine uncharakteristische Kurve (Abb. 7). — Gruppe II: meist schwach-gelbes Pigment;

Methanolextrakt weist niedrige, aber charakteristische Maxima bei 335, 350 und 400 mμ auf, daneben oft noch eins bei 382 mμ, das jedoch im Anstieg des letzten Gipfels verschwinden kann (Abb. 8). Die wenigen pigmentfreien Stämme (E, 150) zeigen nur *ein* Maximum an der gleichen Stelle wie Gruppe I, entsprechend dem letzten Gipfel bei den Pigmentbildnern (Tab. 1).

Abb. 5

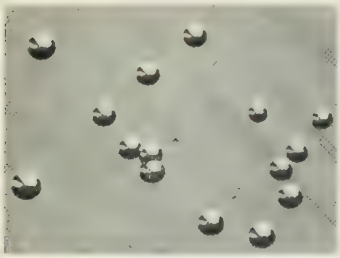


Abb. 6

Abb. 5 und 6. Neisseria catarrhalis II. Stamm 69, auf Blutagar (4×). Abb. 5. 2 Tage bebrütet. Abb. 6. 5 Tage bebrütet

Keiner der Stämme bildete aus *Glucose, Maltose, Fructose* oder *Saccharose* Säure oder aus Saccharose *Polysaccharid*.

Organische Säuren. Keiner der Stämme verwertete Citrat oder Propionat. — Gruppe I: Durch Pyruvat, α-Ketoglutarat und Succinat kräftige, durch cis-Aconitat, Butyrat, Fumarat und Tartrat deutliche Wachstumsförderung.

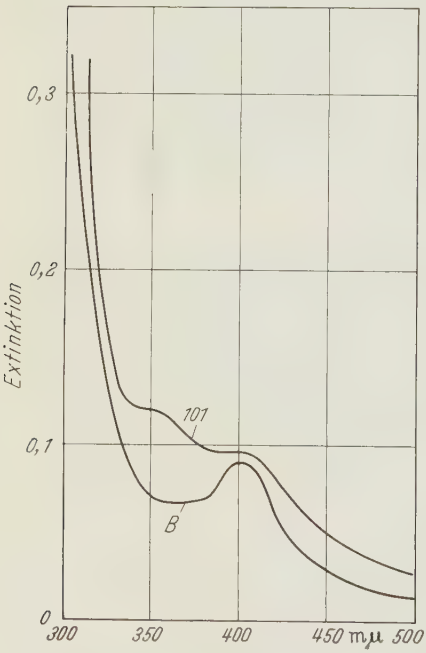


Abb. 7

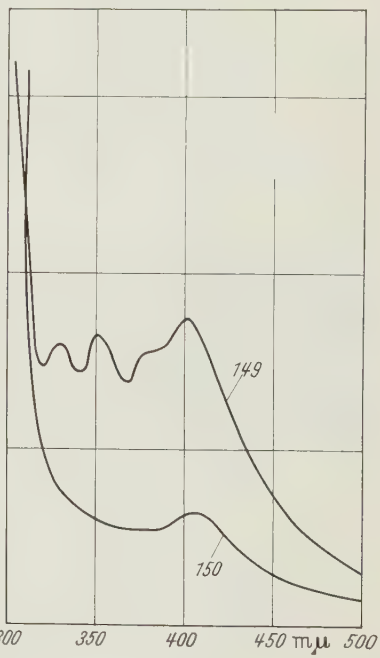


Abb. 8

Abb. 7 und 8. Absorptionskurven der Methanolextrakte, bestimmt im Beckman Recording Spectrophotometer, Modell DK 1. Abb. 7. Gruppe I (Stamm B, 101). Abb. 8. Gruppe II, ein pigmentbildende (149) und ein pigmentfreier Stamm (150)

Unterschiedliches Verhalten der beiden Stämme gegenüber Lactat, Acetat und Malat. — Gruppe II: Keine Verwertung von Butyrat, desgleichen (mit Ausnahme von Stamm 77) von cis-Aconitat, α-Ketoglutarat und Tartrat. Die übrigen Säuren werden von der Mehrzahl der Stämme angegriffen außer von Stamm 126, der sich völlig indifferent verhielt (Tab. 2).

Tabelle 1. *Absorptionsmaxima der Methanolextrakte*
(bestimmt mit Beckman Recording Spectrophotometer, DK 1)

Stamm		Farbton der Extrakte	Absorptionsmaxima (mμ)			
Gruppe I	B	farblos				400
	101	schwach gelblich?		(350)		(400)
	E	farblos				406
	8	schwach gelblich	335	350	(382)	400
	18	schwach gelblich	(332)	350	(382)	400
	77	gelblich	332	350	(382)	(400)
Gruppe II	109	schwach gelblich	330	350	(382)	400
	126	schwach gelblich	332	350	(382)	400
	149	gelblich	332	350	(382)	400
	150	farblos				(410)

Tabelle 2. *Verwertung organischer Säuren durch asaccharolytische Neisserien*
(Nephelometrische Bestimmung mit Photometer „Eppendorf" nach 20stündiger Bebrütung in 0,2% Hefeextraktlösung + 1% Substrat)

Stamm	Lactat	Pyruvat	Acetat	Citrat	cis-Aconitat	α-Ketoglutarat	Succinat	Fumarat	Malat	Propionat	Butyrat	Tartrat	VPR in Pyruvat
Gruppe I													
B	++	++	(+)	−	+	++	++	++	+	−	+	(+)	+
101	−	++	−	−	+	++	++	(+)	−	−	+	+	+
Gruppe II													
E	+	+	+	−	−	−	+	(+)	+	−	−	·	+
8	+	+	(+)	−	−	−	+	+	(+)	−	−	−	+
18	−	−	(+)	−	−	−	(+)	(+)		−	−	−	++
77	+	+	+	−	(+)	+	+	+	+	−	−	+	+
126	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	k.W.
149	+	−	+	−	−	−	+	(+)	+	−	−	−	++

Acetoin aus Pyruvat wurde von allen geprüften Stämmen (außer Stamm 126, der in Gegenwart von Pyruvat nicht wuchs) gebildet, besonders kräftig von den beiden „pyruvatnegativen" Stämmen 18 und 149.

Auf *Tributyrinagar* gutes Wachstum der Gruppe I, kein oder spärliches Wachstum der Gruppe II. — Eine *Urease* ließ sich bei keinem der Stämme nachweisen. — Die Fähigkeit zur *Schwefelwasserstoffbildung* fehlte den beiden Stämmen der Gruppe I sowie den meisten Stämmen

(15/28) der Gruppe II; der Rest bildete H_2S in Spuren. — *Ammoniak* war ebenfalls nur in Spuren nachweisbar, bei Gruppe I jedoch etwas reichlicher als bei Gruppe II, in der 5/27 Stämme eine völlig negative Reaktion gaben.

Die Reaktionen auf *Katalase* und *Cytochromoxydase* fielen dagegen regelmäßig positiv aus. — *Nitrat* wurde von Gruppe I über Nitrit hinaus reduziert, von Gruppe II jedoch nicht angegriffen. — *Nitrit* wurde von Gruppe I schwach und ohne Gasbildung reduziert, während 24/27 Stämme der Gruppe II *Gas* aus NO_2 bildeten; die restlichen drei Stämme, bei denen keine nachweisbaren Gasmengen entstanden, wuchsen bei einer Nitritkonzentration von 0,1% nicht (sondern nur bei 0,03% bzw. 0,01%).

Tabelle 3. *Ergebnisse der Präcipitationsreaktionen*

Antigene		Antiseren				
		Gruppe I	Gruppe II			
Gruppe	Stamm	B	E	8	77	150
I	B	+	–	(+)		–
	101	+	–	+	(+)	–
II	E	–	+	(+)	(+)	–
	8	–	–	+	(+)	–
	18	–	(+)	+	+	–
	50	–	(+)	+	(+)	+
	51	–	–	–	–	+
	59	–	(+)	–	(+)	(+)
	69	–	–	–	(+)	(+)
	77	–	–	–	(+)	–
	109	–	–	(+)	–	+
	113	–	–	(+)	–	+
	118		(+)	+	+	+
	126			+	–	+
	132	–	–	–	–	–
	137	–	+	+	+	+
	142		(+)	+	+	+
	143	–	(+)	+	+	+
	149	–	+	+	(+)	+
	150	–	–	(+)	–	(+)
	154	–	+	(+)	(+)	(+)
	156	–	+	+	(+)	+
	157	–	(+)	–	–	–
	159	–	(+)	–	–	(+)
	165	–	–	–	–	+
	177	–	–	+	+	+
	183	–		(+)	(+)	
	190		+	(+)	(+)	
	194	–	+	+	+	+

Penicillinempfindlichkeit. Gruppe I: beide Stämme wurden durch 0,06 E/ml völlig gehemmt. — Gruppe II: die minimale Hemmungskonzentration betrug für 24/28 Stämme 0,25—0,5 E/ml, für je zwei Stämme 0,125 und 1,0 E/ml.

Spontanagglutination. Gruppe I: beide Stämme bildeten in Normalserum homogene Suspensionen, Stamm 101 war jedoch kochsalzagglutinabel. — Gruppe II: hier war das Verhalten der Stämme unterschiedlicher: zehn Stämme agglutinierten in Serum wie in Kochsalz, fünf Stämme nur in Serum, drei Stämme nur in NaCl-Lösung; mit zehn Stämmen ließen sich in beiden Medien stabile, homogene Suspensionen herstellen.

Die Ergebnisse der *Präcipitationen* zeigt Tab. 3. Die beiden Stämme der Gruppe I besitzen ein gemeinsames Antigen, das der Gruppe II, die serologisch komplizierter zusammengesetzt ist, fehlt; hier verteilt sich auf die verschiedenen Stämme offenbar eine größere Zahl von Partialantigenen in verschiedenen Kombinationen. Während nur *ein* Stamm (132) der Gruppe II mit keinem der vier homologen Antiseren erfaßt werden konnte, gaben die Stämme der Gruppe I auch mit ein oder zwei der vier heterologen Antiseren positive Reaktionen.

Diskussion

Bei der Durchsicht von Originalliteratur und Textbüchern entsteht der Eindruck, daß *Neisseria catarrhalis* in ihren Merkmalen etwas vage und nicht immer einheitlich definiert ist. Vor allem die Kolonien scheinen nach Größe, Form, Farbe und Konsistenz einer so beträchtlichen Variabilität zu unterliegen, daß schon die erste Verdachtsdiagnose ganz unsicher wird.

Für die praktischen Folgen, die aus dieser Unsicherheit resultieren, darf aus der eigenen Erfahrung ein Beispiel gegeben werden. Von zehn Stämmen, die wir aus fremden Sammlungen als *N. catarrhalis* erhielten, waren sechs oxydasenegative Moraxellen (*eine* Quelle), eine *N. sicca*, zwei *N. cinerea* und nur eine *N. catarrhalis*.

Man wird zugeben, daß diese Situation nicht recht befriedigt. Wir haben deshalb versucht, an 30, nach Bergey's Manual als *N. catarrhalis* zu klassifizierenden Stämmen gramnegativer Diplokokken aus dem menschlichen Nasopharynx etwas mehr Einblick in das Wesen dieser „Variabilität" zu gewinnen.

Das erste Ergebnis unserer Untersuchungen bestand darin, daß wir die Stämme ohne Schwierigkeiten in zwei klar trennbare, in sich homogene Gruppen einzuordnen lernten, von denen die eine nur zwei (Gruppe I), die andere dagegen 28 Stämme (Gruppe II) umfaßte.

Die Stämme der *Gruppe I* stimmten mit den von Frosch u. Kolle (1896), Ghon u. Pfeiffer (1902) sowie v. Lingelsheim (1906) gegebenen Beschreibungen überein; sie sind also als *N. catarrhalis* wohl richtig bestimmt.

Allerdings waren die Kolonien unserer Stämme immer butterweich und leicht zu verreiben, während sie den genannten und auch späteren Autoren (Arkwright; Elser u. Huntoon; Kutscher) so trocken und spröde erschienen, daß die Konsistenz als geradezu „mörtelartig" bezeichnet wurde. Diese charakteristische Eigenschaft soll sich jedoch nach einigen Passagen verlieren können (Elser u. Huntoon).

Catarrhalis-Stämme, die denen unserer *Gruppe II* entsprachen, haben als erste offenbar Elser u. Huntoon (1909), später Gordon (1921) und Wilson (1928) gesehen und als einen zweiten Typ betrachtet. Auch Wachstum in *pin point colonies*, wie es bei unseren Gruppe-II-Stämmen nicht selten war, hatte Gordon als „Untergruppe 4" schon beschrieben.

Die Zusammenfassung aller dieser Wachstumstypen, trotz ihrer ins Auge fallenden Unterschiede, in der einen Art *N. catarrhalis* gründete sich ausschließlich auf ihre gemeinsame Indifferenz gegenüber allen geprüften Zuckern, also auf *ein* negatives Merkmal.

Näherliegend erschien uns deshalb, daß die in unserer Gruppe II zusammengefaßten Stämme eine *eigene Art* repräsentieren.

Die Ergebnisse der weiteren Untersuchungen bestätigten diese Annahme. Wie aus Tab. 4 und den Abb. 1—6 ersichtlich, zeigen die beiden Typen nicht nur verschiedene Kolonieformen, sie unterscheiden sich auch morphologisch, biochemisch und serologisch. Nur Typ II bildet offenbar ein Pigment, ist aber anspruchsvoller als Typ I, der bei niedriger Temperatur viel besser wächst und mehr Substrate zu verwerten vermag (organische Säuren, Tributyrin). Als ein wichtiges Differenzierungsmerkmal erscheint uns ferner das Verhalten gegenüber Nitrat und Nitrit: Typ I reduziert Nitrat über Nitrit hinaus, aber ohne Gasbildung, während von Typ II Nitrat nicht angegriffen, Nitrit dagegen denitrifiziert wird. Interessant ist weiterhin, daß die vitalere Art (Typ I) durch Penicillin stärker gehemmt wird als der anspruchsvollere Typ II. Das serologische Verhalten liefert wohl den endgültigen Beweis dafür, daß es sich hier um zwei verschiedene Arten handelt, von denen die zweite im Nasopharynx viel häufiger ist als die erste.

Typ I wurde bereits als *N. catarrhalis* im Sinne der alten deutschen Autoren identifiziert. Es wäre jedoch merkwürdig, wenn unser viel häufigerer Typ II nicht ebenfalls schon früher als eigene Art erkannt worden wäre, und in der Tat decken sich unsere Befunde fast völlig mit der Beschreibung, die v. Lingelsheim (1906, 1908) von seinem *Mikrococcus cinereus* gab: *gramnegative Diplokokken von grobem, ungleichmäßigem Korn, in zarten, grauen bis grauweißen, glattrandigen Kolonien wachsend. Keine Säure aus Glucose, Maltose und Fructose.*

Der einzige Unterschied zu unserem Typ II besteht also darin, daß die meisten unserer Stämme ein schwach gelbliches Pigment bildeten, das aber auf der Blutplatte oft mehr zu „erahnen" ist und erst im Methanolextrakt sicher beurteilt werden kann.

Wir zweifeln also aus zwei Gründen nicht mehr daran, daß unser Typ II mit *M. cinereus* identisch ist: es gibt nach v. Lingelsheim und den eigenen Erfahrungen außer *N. catarrhalis* nur *einen* oxydasepositiven gramnegativen Diplococcus im Nasopharynx, der keine Zucker angreift, und seine Originalbeschreibung stimmt mit den an unseren Stämmen erhobenen Befunden weitgehend überein. Dieser Keim aber ist *M. cinereus* v. Lingelsheim.

Es ist allerdings schwer zu verstehen, daß dieser Keim später niemals mehr wiedergefunden bzw. wiedererkannt wurde. Elser u. Huntoon (1909) beschreiben ihn als *N. catarrhalis*, Typ II, und bemerken gleichzeitig ausdrücklich, daß sie bei ihren umfangreichen Untersuchungen niemals auf den *M. cinereus* gestoßen seien.

Tabelle 4. *Differentialdiagnose zwischen N. catarrhalis und N. cinerea*

Merkmal	N. catarrhalis (Frosch u. Kolle) Holland	N. cinerea (v. Lingelsheim) Murray
Kolonien	ziemlich groß, erhaben, rund, glatt, weißlich (ähnl. Staph. albus); später erhabenes Zentrum und unregelmäßiger Randsaum; manchmal gelblich	kleiner, flach, rund glatt, grau bis grau-gelblich, semiopak (ähnl. N. subflava); auch „pin point colonies".
Blutagar	unter konfluierendem Wachstum keine Veränderung	unter konfluierendem Wachstum grüne Verfärbung
Morphologie	gleichmäßiges Korn	ungleichmäßiges Korn
Pigment	−	+
Wachstum bei 22° C	gut	sehr schwach
Verwertung von		
Butyrat	+	−
cis-Aconitat	+	−
α-Ketoglutarat	+	−
Tributyrin	+	−
Nitratreduktion	über Nitrit hinaus	−
Nitritreduktion	ohne Gas	mit Gas
Penicillinverhalten	hochempfindlich	mäßig empfindlich
Serologie	einheitlich (gemeinsames Antigen, das bei N. cinerea fehlt)	verschiedene Typen (aber keine Reaktion im N. catarrhalis-Antiserum)
Häufigkeit im Nasopharynx	sehr selten	häufiger
Synonyma	Kokkus catarrhalis, R. Pfeiffer Mikrokokkus catarrhalis, Frosch u. Kolle (1896) Diplococcus pharyngis communis, v. Lingelsheim (1906) Micr. catarrhalis, Typ I, Elser u. Huntoon (1909); S. P. Wilson (1928) Micr. catarrhalis, Untergruppen 1 und 2, Gordon (1921)	Micrococcus cinereus, v. Lingelsheim (1906) Micr. catarrhalis, Typ II, Elser u. Huntoon (1909); S. P. Wilson (1928) Micr. catarrhalis, Untergruppen 3 und 4, Gordon (1921) Neisseria pseudo-catarrhalis, Huntoon (1934)

Für die weiter oben zitierten Befunde von Gordon (1921) und Wilson (1928) gilt das gleiche: sie isolierten den Keim, erkannten ihn aber nicht. Im Jahre 1934 gab Huntoon die Auffindung einer neuen Art, die er *N. pseudo-catarrhalis* nannte, bekannt, die sich vom *M. cinereus* ebenfalls nicht unterscheidet. So werden unter *N. catarrhalis* in den Textbüchern noch heute entweder zwei „colonial variants" beschrieben (Schaub u. Mitarb.), von denen nach unserer Auffassung die eine mit *M. cinereus* identisch ist, oder der *M. cinereus* wird zwar erwähnt, aber als Varietät von *N. catarrhalis* betrachtet (Wilson u. Miles).

Soweit *M. cinereus* aber als eigene Art angeführt wird (Dopter 1921; Lehmann u. Neumann 1927), sind die Angaben offenbar von v. Lingelsheim übernommen. Kutscher (1912) gibt allerdings eine abweichende Beschreibung, doch da wir keine Originalarbeit dieses Autors finden konnten, in der diese Art erwähnt wird, vermuten wir, daß ihm bei der Abfassung seines Handbuchartikels hier ein Irrtum unterlaufen ist. Ohnehin wäre nur die erste Beschreibung (v. Lingelsheim 1906) gültig.

Durch Murray (1939) wurde der Keim als *Neisseria cinerea* in die 5. Auflage von Bergey's Manual aufgenommen, in der 7. Auflage (1957) schließlich wieder fortgelassen.

Bevor wir als Abschluß eine neue Beschreibung der beiden Arten geben, sei noch auf eine Merkwürdigkeit hingewiesen: während *N. catarrhalis* bis zum Jahre 1927 als ein ausgesprochen häufiger Saprophyt des menschlichen Nasopharynx hingestellt wird, ist sie ab 1928 eher selten.

Ghon u. Pfeiffer (1902) fanden *N. catarrhalis* bei 59% der Untersuchten. Davis (1905) bezeichnete sie als „common organism" des Respirationstraktes, v. Lingelsheim (1906) traf sie in Abstrichkulturen des Nasopharynx „fast stets", und Arkwright (1907) wies sie auf der Nasenschleimhaut von 35% der Individuen nach. Von 114 Stämmen saprophytischer Neisserien gehörten bei Elser u. Huntoon (1909) 56%, unter den 226 Stämmen von Gordon (1921) 43% zu *N. catarrhalis*. Nach den Erfahrungen von Lehmann u. Neumann (1927) beherbergen 61% aller Untersuchten diesen Keim. — Aber schon ein Jahr später hatte sich die Lage völlig gewandelt. Jetzt betrug der Anteil der *N. catarrhalis* an allen saprophytischen Stämmen ihrer Gattung nur noch 6,6% (S. P. Wilson 1928) bzw. 2,7% (G. S. Wilson u. Smith 1928). Oliver (1930) sprach dann zum erstenmal die Ansicht aus, daß *N. catarrhalis* viel seltener sei als allgemein angenommen werde. Berger u. Wulf (1961) fanden sie in einer Serie von 202 Stämmen ebenfalls nur sechsmal (3%). Selbst wenn wir mit der Mehrzahl der zitierten Autoren *N. catarrhalis* und *N. cinerea* als *eine* Art betrachten, entspricht auch der von uns (Berger 1961c) mit einem Elektivnährboden ermittelte, relativ hohe Befall von 26/172 Individuen (15%) eher den niedrigen Werten der neueren Untersucher.

Versucht man, diese Werte nach den beiden Arten getrennt aufzuschlüsseln, so ergibt sich eine relative Zunahme von *N. cinerea* auf Kosten von *N. catarrhalis* im Laufe der letzten Jahrzehnte.

Bei Elser u. Huntoon (1909) war Typ I *(N. catarrhalis)* noch häufiger als Typ II *(N. cinerea)*, und auch bei Gordon (1921) betrug das Verhältnis beider Arten zueinander noch 3:1. Die sechs „Catarrhalis"-Stämme, die Wilson (1928) fand, gehörten aber bereits sämtlich zum Typ II *(N. cinerea)*, und bei unseren eigenen Stämmen lag das Verhältnis schließlich bei 1:27 (Berger 1961c).

Während wir über die *absolute* Zu- oder Abnahme von *N. cinerea* in Ermangelung genauer Zahlen nichts wissen, läßt sich mit einiger

Sicherheit sagen, daß *N. catarrhalis*, vor kaum mehr als 30 Jahren noch ein fast regelmäßiger Bewohner des normalen Nasopharynx, heute als ausgesprochen selten gelten muß; ihre Häufigkeit ist, beim Vergleich der eigenen Werte mit denen der Literatur, von rund 50% auf 0,6%, also um das Hundertfache, gesunken.

Eine Erklärung für dieses Phänomen wissen wir nicht zu geben. Denn selbst wenn diese Werte nur angenähert stimmen, und wenn wir damit rechnen, daß früher in einer gewissen Zahl von Fällen Moraxellen mit Neisserien oder, vor v. Lingelsheim, saccharolytische Stämme mit *N. catarrhalis* verwechselt wurden, so läßt sich damit der ebenso starke wie plötzliche Abfall in der Häufigkeit dieses Keimes um das Jahr 1928 nicht erklären. Auch die Ära der Sulfonamide und Antibiotica begann erst 10 Jahre später.

Beschreibung der Arten

Neisseria catarrhalis: gramnegative, mittlere Diplokokken von typischer Lagerung und gleichmäßigem Korn; keine Tetraden.

Auf Blutagar ziemlich große, erhabene, weiße Kolonien, zunächst mit glattem Rand, später mit flachem unregelmäßigem Randsaum. Gutes Wachstum auf Nähragar und bei 22° C.

Bouillon: klar oder schwache Trübung, meist Oberflächenwachstum (Häutchen, Rand) und Bodensatz.

Hämolyse in Blutbouillon, nicht auf Blutagar.

Keine Säure aus Kohlenhydraten. Kein Polysaccharid aus Saccharose. Mehrere organische Säuren werden, teils recht kräftig, angegriffen (Pyruvat, cis-Aconitat, α-Ketoglutarat, Succinat, Fumarat, Butyrat, Tartrat); Citrat und Propionat nicht verwertet. Acetylmethylcarbinol aus Pyruvat.

Tributyrin wird verwertet.

Geringe Ammoniakbildung. Keine Bildung von Indol und Schwefelwasserstoff. Keine Harnstoffspaltung. Gelatine nicht verflüssigt.

Nitrat über Nitrit hinaus reduziert, Nitrit ohne Gasbildung reduziert.

Katalase und Cytochromoxydase nachweisbar.

Hochempfindlich gegen Penicillin.

Manche Stämme sind kochsalz- und/oder serumagglutinabel.

Neisseria cinerea: gramnegative Diplokokken, oft auch Tetraden, von unregelmäßigem Korn.

Auf Blutagar feine, graue bis grau-gelbliche, flache, glattrandige S-Kolonien; nicht selten auch „pin point colonies". Auf Nähragar gutes, bei 22° C sehr schwaches Wachstum.

Bouillon: klar oder schwache Trübung, meist Oberflächenwachstum (Häutchen, Rand) und Bodensatz.

Hämolyse durch einen Teil der Stämme in Blutbouillon, niemals auf Blutagar.

Schwach gelbes Pigment von den meisten Stämmen gebildet.

Keine Säure aus Kohlenhydraten. Kein Polysaccharid aus Saccharose. Einige organische Säuren (Lactat, Pyruvat, Acetat, Succinat, Fumarat, Malat) von der Mehrzahl der Stämme, aber meist nur schwach, angegriffen; cis-Aconitat, α-Ketoglutarat und Tartrat nur ausnahmsweise, Butyrat, Citrat und Propionat nicht verwertet. Acetylmethylcarbinol aus Pyruvat.

Tributyrin wird nicht verwertet.

Sehr geringe Ammoniak- und Schwefelwasserstoffbildung. Kein Indol. Keine Harnstoffspaltung. Gelatine nicht verflüssigt.

Nitrit zu gasförmigem Stickstoff reduziert. Keine Reduktion von Nitrat.

Katalase und Cytochromoxydase regelmäßig nachweisbar.

Gering empfindlich gegen Penicillin.

Zahlreiche Stämme sind kochsalz- und/oder serumagglutinabel.

Zusammenfassung

Es wurden 30 Stämme asaccharolytischer Neisserien aus dem menschlichen Nasopharynx untersucht. Die Stämme ließen sich in zwei Gruppen einteilen, von denen die eine mit *N. catarrhalis*, die andere mit *N. cinerea* identisch ist. Neue Beschreibungen der beiden Arten werden gegeben. Seit ihrer Entdeckung vor der Jahrhundertwende ist *N. catarrhalis* offenbar von einem allgemein verbreiteten zu einem seltenen Keim geworden.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

Arkwright, J. A.: On the occurrence of the Micrococcus catarrhalis in normal and catarrhal noses and its differentiation from other gramnegative cocci. J. Hyg. (Lond.) **7**, 145 (1907).

Berger, U.: Oxydationsfermente bei Veillonella alcalescens. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **146**, 440 (1960).

Berger, U.: Polysaccharidbildung durch saprophytische Neisserien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **181**, 345 (1961a).

Berger, U.: Untersuchungen über die Pigmentbildung durch Neisserien. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 461 (1961b).

Berger, U.: Ein Elektivnährboden für Neisseria catarrhalis. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **183**, 135 (1961c).

Berger, U.: Reduktion von Nitrat und Nitrit durch Neisseria. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 45 (1961d).

Berger, U.: Zur Verwertung organischer Säuren durch Neisseria. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. (im Druck).

Berger, U., u. B. Wulf: Untersuchungen an saprophytischen Neisserien. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 257 (1961).

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7. Aufl. Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1957.

Davis, D. J.: Studies in meningococcus infections. J. infect. Dis. **2**, 602 (1905).

Dopter, Ch.: L'infection méningococcique. Paris: Baillière & Fils 1921.

Elser, W. J., and F. M. Huntoon: Studies on meningitis. J. med. Res. **20**, 371 (1909).

Frosch, P., u. W. Kolle: Die Mikrokokken, in C. Flügge: Die Mikroorganismen, Bd. II, 3. Aufl. Leipzig: Vogel 1896.

Ghon, A., u. H. Pfeiffer: Der Mikrococcus catarrhalis (R. Pfeiffer) als Krankheitserreger. Z. klin. Med. **44**, 262 (1902).

Gordon, J. E.: The gram-negative cocci in "colds" and influenza. Influenza studies VII. J. infect. Dis. **29**, 462 (1921).

Huntoon, F. M.: The characteristics of a probable new member of the Neisserieae. J. Bact. **27**, 108 (1934).

Kutscher, K. H.: Übertragbare Genickstarre, in Kolle, W., u. A. v. Wassermann: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd. IV, 2. Aufl. Jena: Fischer 1912.

Lehmann, K. B., u. R. O. Neumann: Bakteriologie, insbesondere bakteriologische Diagnostik, Bd. II, S. 259, 7. Aufl. München: Lehmann 1927.

Lingelsheim, W. v.: Die bakteriologischen Arbeiten der Kgl. Hygienischen Station zu Beuthen O.-Schl. während der Genickstarreepidemie in Oberschlesien im Winter 1904/05. Klin. Jb. **15**, 373 (1906).

Lingelsheim, W. v.: Beiträge zur Ätiologie der epidemischen Genickstarre nach den Ergebnissen der letzten Jahre. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **59**, 457 (1908).

Murray, E. G. D.: In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 5. Aufl. Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1939.

Oliver, J. O.: The complement fixation test in relation to the gonococcus and allied organisms. J. Hyg. (Lond.) **29**, 259 (1930).

Schaub, J. G., M. K. Foley, E. G. Scott and W. R. Bailey: Diagnostic Bacteriology, 5. Aufl. St. Louis: C. V. Mosby 1958.

Warner, G. S., J. E. Faber and M. J. Pelczar: A serological study of certain members of the aerobic nonpathogenic Neisseria group. J. infect. Dis. **90**, 97 (1952).

Wilson, S. P.: An investigation of certain gram-negative cocci met with in the nasopharynx, with special reference to their classification. J. Path. Bact. **31**, 477 (1928).

Wilson, G. S., and A. A. Miles: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 4. Aufl. London: E. Arnold Publ. Ltd. 1955.

Wilson, G. S., and M. M. Smith: Observations on the gram-negative cocci of the nasopharynx, with a description of Neisseria pharyngis. J. Path. Bact. **31**, 597 (1928).

Dozent Dr. U. Berger.
Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten, 2 Hamburg 20, Martinistraße 52

Zeitschrift f. Hygiene 148, 282—295 (1962)

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen a. N

Untersuchungen über die Gefahr einer Verunreinigung des Pockenimpfstoffes durch ECBO-Viren

Von

ANTON MAYR*

(Eingegangen am 15. Januar 1962)

Das Vaccinevirus läßt sich im bebrüteten Hühnerei, in der Gewebekultur und in fast allen kleinen Versuchstieren gut zur Vermehrung bringen. Trotzdem wird der Pockenimpfstoff nach wie vor auf der ganzen Welt als Dermovaccine vom Rind gewonnen und für die Erst- und Wiederimpfung beim Menschen verwendet. Die Gründe hierfür sind häufig diskutiert worden. Eine kritische Zusammenstellung findet sich bei HERRLICH u. MAYR[9].

In Analogie zum Menschen hat man in den letzten Jahren mit Hilfe der modernen Gewebekulturtechnik auch im Kot klinisch gesunder wie kranker Tiere eine Reihe cytopathogener Viren gefunden, die nach ihren morphologischen, biologischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften zu der großen Gruppe der Enteroviren gehören. Sie sind im wesentlichen charakterisiert durch ihre Cytopathogenität für Kulturen bestimmter Zellarten, durch ihre Affinität zum Digestionstrakt, durch ihre Größe bis zu 35 mμ, ihren Aufbau und durch ihre Äther- und Chloroformresistenz[2,4,14].

Die wichtigsten bisher bekannten Enteroviren beim Rind sind ECBO (enteric-cytopathogenic-bovine orphan)-Viren. Über ihre Beziehung zu bestimmten Krankheiten beim Rind weiß man noch wenig. Die ermittelten S_{20}-Werte der ECBO-Viren lassen auf Teilchendurchmesser von 25—30 mμ schließen. Alle bisher von uns untersuchten ECBO-Viren waren chloroformresistent[2,14].

Die ECBO-Viren sind unter unseren Rinderbeständen weit verbreitet. Das Virus wird bevorzugt mit dem Kot, vielleicht auch mit dem Nasensekret und Speichel, ausgeschieden. Die Infektion erfolgt durch Kontakt und indirekt über die Aufnahme virushaltigen Futters, Wassers usw. Die neugeborenen Tiere erwerben durch die Aufnahme von Antikörpern mit dem Colostrum zunächst eine passive Immunität. Mit deren Abklingen infizieren sich die Jungtiere, machen i. R. eine latente, vielleicht auch eine klinisch inapparente Infektion durch und werden dabei

* Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. A. HERRLICH, in Dankbarkeit zum 60. Geburtstage gewidmet.

aktiv immun. Wieweit sich diese Immunität auch auf den Darmtrakt erstreckt, ist noch nicht geklärt.

ECBO-Virus-Ausscheider findet man jedenfalls bevorzugt bei Jungrindern. Da gerade Tiere dieser Altersgruppe für die Herstellung der Pocken-Dermovaccine herangezogen werden, wurde in letzter Zeit häufig darüber diskutiert, ob diese Erreger in die Pockenimpfstoffe gelangen können. Dabei dachte man besonders an die Gefahr einer Verunreinigung der Impffläche von außen her über den Kot, das Futter, die Einstreu usw., weniger an eine Einschwemmung der ECBO-Viren über den Blutweg und Ansiedlung im Impfbezirk der Haut.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit diesem Problem. Einmal untersuchten wir zahlreiche Pockenimpfstoffe des In- und Auslandes auf eine Verunreinigung mit ECBO-Viren. Zum anderen klärten wir experimentell, ob zwischen ECBO- und Vaccineviren in Zellen, in denen sich beide Virusarten gut vermehren, eine Interferenz besteht. Und schließlich infizierten wir künstlich zwei colostrumfrei aufgezogene Kälber und vier Jungrinder mit ECBO-Viren, stellten nach beginnender Virusausscheidung im Kot von diesen Tieren in der bei den Impfanstalten geübten Weise Pocken-Dermovaccine her und untersuchten diese Proben auf Anwesenheit von ECBO-Viren.

Über die Ergebnisse wird berichtet.

Materialien und Methoden

1. Pockenimpfstoffe, Vaccine- und ECBO-Virusstämme

Die Pockenimpfstoffe erhielten wir als Rohmaterial oder Stammlymphe von verschiedenen Impfanstalten des In- und Auslandes. Bis zu ihrer Untersuchung wurden sie bei $-20°$ C aufbewahrt. Für die experimentellen Versuche verwendeten wir den Dermovaccinestamm CVA (Ankara 10/54) und den ECBO-Stamm 93. Die Abstammung und biologischen Daten dieser Stämme sind bereits früher beschrieben worden[2,9].

2. Zellkulturen für die Anzüchtung der ECBO-Viren

Zur Anzüchtung der ECBO-Viren aus dem Kot und den Pockenimpfstoffen benutzten wir Kälbernierenkulturen. Die Zellen hierfür wurden nach der von Dulbecco beschriebenen und von Youngner modifizierten[5,17] Trypsinierungstechnik gewonnen und kultiviert. Zum Anzüchten der Kulturen diente Earlesche Salzlösung mit 10% Kälberserum und 0,5% Lactalbumin-Hydrolysat mit dem üblichen Zusatz von Antibiotica und Phenolrot. Vor der Beimpfung wechselten wir das Anzuchtmedium gegen ein Erhaltungsmedium aus. Da das Anzuchtmedium 10% Kälberserum enthielt, in dem möglicherweise gegen ECBO-Viren gerichtete Antikörper enthalten sein konnten, wuschen wir die Kulturen vor der Zugabe des Erhaltungsmediums zweimal mit der von Dulbecco u. Vogt angegebenen phosphatgepufferten Salzlösung PBS[6]. Das Erhaltungsmedium bestand aus Earlscher Lösung, 0,5% Lactalbumin-Hydrolysat und 2% Pferdeserum mit dem üblichen Anteil Phenolrot und Antibiotica.

Für die Anzüchtungen und Titrierungen verwendeten wir Röhrchenkulturen, für die Virusvermehrung Rouxschalen-Kulturen.

3. Anzüchtung der ECBO-Viren aus Pockenimpfstoff und Kotproben

In beiden Fällen benutzten wir für die Anzüchtung und Isolierung der ECBO-Viren den *Chloroform-Resistenztest* nach Mayr und Bögel[2,14]. Das Vaccinevirus wird durch die Chloroformbehandlung zerstört, während die ECBO-Viren quantitativ chloroformstabil sind. In einzelnen Fällen können sich winzige Restmengen von Vaccinevirus in der denaturierten Schicht der Chloroformgemische infektiös erhalten. Durch Verdünnung der Animpfdosis bei der Anzüchtung lassen sich diese einzelnen infektiösen Vaccineviruseinheiten leicht entfernen. In Zweifelsfällen wurden bei den Subpassagen erneut Chloroformresistenzprüfungen eingeschaltet.

Das Rohmaterial der Pockenimpfstoffe wurde 1:5 mit physiologischer NaCl-Lösung (p_H 7,1) im Mörser verrieben, danach bei $-20°$ C eingefroren, bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut und dann 20 min lang bei 3000 UpM und $+4°$ C zentrifugiert. Der Überstand bildete das Ausgangsmaterial für die Anzuchtversuche. Es wurden davon zwei Versuchsserien angesetzt.

In der ersten Anzuchtserie verimpften wir das Virusausgangsmaterial ohne Chloroformbehandlung auf jeweils zehn Kälbernierenkulturen (0,1 ml pro Röhrchen). Hierbei sollte geprüft werden, ob sich neben dem Vaccinevirus in dem Ausgangsmaterial eventuell enthaltene kleine Fremdbeimengungen an ECBO-Viren mitvermehrten. I.R. waren die Kulturen nach 2–3 Tagen durch die Vermehrung des Vaccinevirus total zerstört. Die daraus gewonnene Virusernte schüttelten wir dann mit 10—50% Chloroform nach der von uns schon beschriebenen Methode[14] aus und verimpften die „wäßrige Phase" erneut auf Kälbernierenkulturen. Falls binnen 6—7 Tagen kein cytopathogener Effekt auftrat, legten wir von dem Medium mit den künstlich aufgeschlossenen Zellen weitere Subpassagen an. I.R. führten wir drei bis zehn Passagen durch. Ließ sich während dieser Passagen kein ECBO-Virus nachweisen, galt die Anzüchtung als negativ *(Methode I)*. Zur Sicherung der Isolierungstechnik liefen entsprechende Kontrollen parallel, in denen wir dem Pockenimpfstoff künstlich ECBO-Viren in geringer Menge beifügten.

In der zweiten Anzuchtserie wurde das Virusausgangsmaterial sofort mit 10% Chloroform bei $+4°$ C 1 Std ausgeschüttelt, über Nacht in den Kühlschrank gestellt und am nächsten Morgen 10 min nach vorherigem Aufschütteln in einer Christ-Zentrifuge bei 7000 U/min abzentrifugiert. Die obere Schicht (wäßrige Phase) und die mittlere Schicht (Präcipitat) dienten dem Virusnachweis.

Wir heberten die wäßrige Phase ab und stellten sie für kurze Zeit in einer offenen Petri-Schale in den Brutschrank, damit die Chloroformreste (schädigen die Kulturen) verdunsten konnten. Danach verimpften wir die Probe auf jeweils zehn Kälbernierenkulturen. Trat innerhalb von 6—7 Tagen kein cytopathogener Effekt auf, wurden, wie schon beschrieben, drei bis zehn weitere Blindpassagen angelegt *(Methode II)*. Bei positivem Anzuchterfolg wurde die Identität des Virus in der Neutralisation mit spezifischen ECBO- und Vaccineantiseren bestimmt.

Zusätzlich beimpften wir bebrütete Hühnereier auf die Chorioallantoismembran, um eine weitere Sicherheit zu haben.

Zur Erhöhung des Anzuchterfolges verimpften wir auch die mittlere Schicht der Zentrifugate, die vorwiegend aus ausgefälltem Protein besteht. Hierzu wurde die gallertige, dicke Masse 1:10 mit m/90 NaCl-Phosphatpuffer (p_H 7,3) verrieben, im Vakuum das Chloroform abgezogen (kurzes Erwärmen genügt hier nicht) und darauf auf zehn weitere Kälbernierenkulturen verimpft. Bei negativem Ausfall der Anzuchtpassage führten wir das Material wieder wie oben in drei bis zehn Blindpassagen weiter *(Methode III)*. Entsprechende Kontrollen, wie im Versuch vorher, wurden auch hier mitgetestet.

Bei der *Isolierung der Enteroviren aus den Kotproben* hielten wir uns mit kleinen Abänderungen an die schon beschriebene Technik[14]. Die Herauszüchtung aus den Rinderfaeces bereitete keine Schwierigkeiten. Die Identität der Viren kontrollierten wir durch Serumneutralisationsteste in der Gewebekultur nach der üblichen Technik.

Der frisch manuell aus dem Rectum gewonnene Kot wurde in sterilen Gefäßen gesammelt und im Verhältnis 1:10 mit PBS gemischt. Die Kotsuspension schüttelten wir dann bei +4° C maschinell 30 min lang und zentrifugierten das Ganze bei 3000 U/min 30 min lang ab. Zu dem Überstand gaben wir gleiche Teile Chloroform und schüttelten abermals 1 Std bei +4° C. Anschließend kam die Mischung über Nacht in den Kühlschrank. Am nächsten Morgen wurde die Kot-Chloroformmischung 30 min wieder bei 3000 U/min abzentrifugiert, der Überstand gewonnen und nochmals auf die gleiche Weise zentrifugiert. Die Chloroformreste des letzten Überstandes wurden, wie schon beschrieben, in einer offenen Petri-Schale im Brutschrank verdunstet und danach der Überstand selbst auf je zehn Kälbernierenkulturen verimpft. Bei negativem Ausfall der Anzuchtpassage wurden weitere Subpassagen angelegt.

4. Interferenzversuche

Für die Interferenzversuche benutzten wir Kälbernierenkulturen. In diesem Zellsystem vermehren sich Vaccine- wie ECBO-Viren gleich gut. Bei einer Impfstoffherstellung wird auf die rasierte, desinfizierte und scarifizierte Haut der Bauch- und Inguinalgegend des Rindes das Vaccinevirus cutan verimpft. ECBO-Viren, die in den Impfstoff gelangen sollen, müßten sich *nach* der Vaccineinfektion an der Impfstelle ansiedeln. Diesen Vorgang imitierten wir in der Kultur. Die Kälbernierenkulturen wurden gleichmäßig mit Dermovaccinevirus (Stamm CVA) in einer Konzentration von etwa 10^5 Ei-ID_{50} angeimpft. Nach vierstündiger Adsorptionszeit bei +37° C saugten wir das Impfmedium ab und wuschen die Kulturen mehrmals mit Earlescher Lösung. Nach Zugabe von neuem Erhaltungsmedium (vgl. vorher) beimpften wir in verschiedenen Zeitabständen die Kulturen zur Superinfektion mit Verdünnungen von 10^{-1}

bis 10^{-8} des ECBO-Virus 93. Die Interferenzversuche wurden mit Verdünnungen von ECBO-Viren angelegt, weil wenige infizierende ECBO-Viruseinheiten durch die vorausgehende Vaccineinfektion in ihrer Vermehrung möglicherweise gehemmt werden, bei hohen Dosen aber ein Interferenzeffekt verschleiert werden könnte.

Den Zeitraum für die Nachimpfung der Kulturen mit den ECBO-Viren staffelten wir von 4—24 Std.

Interferenz- und Kontrollkulturen bebrüteten wir bei + 37° C so lange, bis ein deutlich sichtbarer cytopathogener Effekt auftrat. Die negativen Kulturen entnahmen wir am 5. Tage p.inf.

Um das Vaccinevirus auszuschalten, wurden alle positiven und negativen Kulturröhrchen der einzelnen Verdünnungsreihen mit 10% Chloroform ausgeschüttelt und wie im „Chloroform-Resistenztest" behandelt. Die jeweiligen „wäßrigen Phasen" überprüften wir dann auf ihren Gehalt an ECBO-Virus durch Verimpfung auf neue Kulturröhrchen. Aus den Titerunterschieden zwischen den einzelnen Versuchsreihen und den in gleicher Weise behandelten Kontrollen konnte auf Interferenzvorgänge geschlossen werden.

Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Interferenz zwischen Vaccine- und ECBO-Viren suchten wir durch laufende Beobachtung der cytopathogenen Veränderungen in den „Versuchskulturen" zu erhalten. Der durch das Vaccinevirus verursachte cytopathogene Effekt (schollige Degeneration ohne typische Abkugelung, langsame Lysis) ist von dem der ECBO-Viren (typische Abkugelungsphase, schnelle Lysis) so stark verschieden, daß bereits mikroskopisch eine Kontrolle möglich ist.

5. Bestimmung der Infektiositätstiter

Die Titer des Vaccinevirus wurden im bebrüteten Hühnerei durch Beimpfung der Chorioallantoismembran, in Schweinenieren- und Kälbernierenkulturen, die Titer der ECBO-Viren in Kälbernierenkulturen nach der üblichen Technik bestimmt. Die angegebenen Titer beziehen sich auf 0,1 ml und sind nach der 50%-Methode von BEHRENS[1] und KÄRBER[10] ermittelt worden.

Versuche und Ergebnisse

Insgesamt wurden die Rohmaterialien (abgenommene und bei — 20° C gelagerte Vaccinepusteln von der Haut des Rindes) von 59 verschiedenen Impfstoffchargen aus Impfstoffgewinnungsanstalten des In- und Auslandes untersucht. Zusätzlich prüften wir noch zwei Stammlymphen verschiedener Chargen. Pro Charge sind stets mehrere Proben zu je 2—3 g Rohmaterial überprüft worden. Aus keinem Impfstoffmaterial konnten mit den benutzten drei Methoden (Anzüchtung vor der Chloroformreinigung [Methode I], Anzüchtung der wäßrigen Phase nach der Chloroformreinigung [Methode II], Anzüchtung der denaturierten Phase der

Chloroformgemische [Methode III]) ECBO-Viren isoliert werden. Auch die Subpassagen blieben erfolglos. Zum Teil sind über zehn Subpassagen durchgeführt worden. Die Anzuchtversuche aus den künstlich mit ECBO-Viren verunreinigten Pockenimpfstoff-Kontrollen waren dagegen alle bereits in der ersten bzw. zweiten Anzuchtpassage positiv, obwohl stets nur wenige Infektionseinheiten dem Impfstoff beigemengt wurden. Alle überprüften Pockenimpfstoffe wiesen hohe Vaccinevirus-Titer auf. Sie lagen bei Titrierung auf der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos zwischen $10^{-5,8}$ und $10^{-7,1}$ Ei-ID_{50}.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tab. 1 zusammengestellt. Die negativen Ergebnisse der Untersuchung von 61 Pockenimpfstoffen auf Verunreinigung mit ECBO-Viren veranlaßten uns, zunächst zu prüfen, ob zwischen Vaccine- und ECBO-Viren eine Interferenz besteht. Als Virus, das die Interferenz erzeugt (interferierendes Virus), diente das Vaccine-Virus und als Virus, dessen Vermehrung gehemmt werden sollte („Challenge"-Virus), das ECBO-Virus, Stamm 93. Die Gründe für diese Versuchsanordnung sind im Kapitel „Materialien und Methoden" beschrieben, ebenso die Technik der Interferenzversuche. Als Wirtssystem benutzten wir Kälbernierenkulturen, nachdem wir vorher festgestellt hatten, daß sich in diesen Kulturen beide Erreger gleich gut vermehren, aber unterschiedliche cytopathogene Effekte erzeugen. Bei interferierenden Eigenschaften des Vaccinevirus wäre zu erwarten gewesen, daß beim „Challenge"-Virus eine gleichmäßige, verminderte Ausbeute an infektiösen und antigenen Einheiten auftritt.

Die Versuche lieferten genau das gegenteilige Resultat. Das ECBO-Virus wurde nicht gehemmt. Es ging vielmehr in den mit dem Vaccinevirus verschieden lang vorbehandelten Kulturen besser an, was in einer Titererhöhung gegenüber den Kontrollen zum Ausdruck kam. Die Ergebnisse gibt die Tab. 2 wieder.

Wie aus der Tab. 2 ersichtlich ist, waren die Titer der verimpften ECBO-Virussuspensionen in den unbehandelten Kontrollen signifikant niedriger als in den 18—24 Std vorher mit Vaccinevirus vorbehandelten Kälbernierenkulturen. Wurden die ECBO-Viren 4 Std nach der Vaccinevirus-Infektion verimpft, so glichen sich die Titer annähernd. Eine umgekehrte Beeinflussung bestand nicht, d. h. das Vaccinevirus vermehrte sich mit und ohne ECBO-Viruszusatz gleich gut.

Auch durch die Kontrolle des cytopathogenen Effektes in den Interferenzkulturen konnte deutlich bewiesen werden, daß sich das ECBO-Virus in den vorher mit Vaccinevirus geimpften Kulturen gut vermehrte.

Nach diesen Versuchen schied eine Interferenz zwischen Vaccine- und ECBO-Viren als Ursache für die negativen Ergebnisse der ECBO-Virus-Isolierungsversuche aus den Pockenimpfstoffen aus. Zwei Möglichkeiten blieben noch übrig: 1. Unter all den Rindern, von denen die 61 unter-

suchten Pockenimpfstoffproben stammten, war zufällig kein einziges, das ECBO-Viren ausschied oder beherbergte. Nach unseren Untersuchungen über die Verbreitung der ECBO-Viren ist dies sehr unwahrscheinlich. 2. Die

Tabelle 1

Überblick über die Ergebnisse der Isolierung von ECBO-Viren aus Pockenimpfstoffen

Versuchsgruppe	Art der untersuchten Pockenimpfstoff-Proben		Erfolg des ECBO-Virusnachweises bei Methode		
	Zahl	Nummern	I	II	III
I	19	1—17 (1960) 14—15 (1959)	0	0	0
II	2 Stammlymphen	6 (1957) 9 (1958)	0	0	0
III	9	156—158a 156—158b ERM 8/61 ERM 43/61a ERM 43/61b	0	0	0
IV	12	2—8 (1961) 1 (1958), 18 (1960) 2/61b, 4/61b	0	0	0
V	3	149, 150a 150b	0	0	0
VI	9	448, 493, 514, 543, 465, 469, 470, 471, 564	0	0	0
VII	7	207, 208, 103a—e	0	0	0
Kontrollen	3	3 Dermovaccinen künstlich mit ECBO-Viren verunreinigt	+ + +	+ + +	0 + 0

Zeichenerklärung: I = Anzüchtung vor der Chloroformreinigung.
II = Anzüchtung der wäßrigen Phase nach der Chloroformreinigung.
III = Anzüchtung der denaturierten Phase nach der Chloroformreinigung.
\+ = ECBO-Virusnachweis war positiv.
0 — In der Anzuchtpassage und in den folgenden Subpassagen konnte kein ECBO-Virus nachgewiesen werden.

ECBO-Viren haben keine Affinität zu den Epithelschichten der Haut des Rindes und können sich, auch wenn sie in diese Zellen gelangen, dort nicht vermehren.

Beide Punkte suchten wir experimentell in den folgenden Versuchen zu klären.

Zuerst infizierten wir zwei colostrumfrei aufgezogene Kälber, die keine Antikörper gegen ECBO-Viren hatten, künstlich über das Trinkwasser mit dem ECBO-Virusstamm 93. Die Tiere wurden in Isolierställen gehalten, täglich klinisch kontrolliert und auf eine Ausscheidung von ECBO-Viren im Kot untersucht. Bereits nach 24 Std schieden beide Tiere ECBO-Virus im Kot aus. Nach 48 Std trat bei Kalb Nr. 6,207 eine Temperaturerhöhung bis 40,0° C auf. Die Virusausscheidung hielt bei beiden Tieren weiter an. Zu diesem Zeitpunkt impften wir beide Kälber nach der in

Tabelle 2. *Ergebnis der Interferenzversuche zwischen Vaccine-(interferierendes-) und ECBO-(„Challenge"-)Virus in Kälbernierenkulturen*

Versuch	Titer der verimpften ECBO-Virussuspension ($-\log KID_{50}$)			
	in den mit Vaccinevirus vorbehandelten Kulturen			in den unbehandelten Kontrollkulturen
	Impfung 4 Std nach Vorbehandlung mit Vaccinevirus	Impfung 18 Std nach Vorbehandlung mit Vaccinevirus	Impfung 24 Std nach Vorbehandlung mit Vaccinevirus	
I	5,5	6,5	6,5	5,0
II	4,8	5,5	5,7	4,5
III	6,0	7,1	7,3	5,8

den Impfstoffanstalten geübten Technik cutan mit dem Dermovaccine-Virusstamm CVA auf die rasierte und scarifizierte Haut der Inguinalgegend. Ein Schutzverband wurde nicht angelegt, so daß die Impfstelle laufend mit Kot und Einstreu in Berührung kam. Die Kälber schieden bis zur Impfstoffabnahme laufend weiter ECBO-Virus im Kot aus. Parallel hierzu entwickelten sich an der Impfstelle typische Vaccinepusteln, die so dicht nebeneinander lagen, daß eine konfluierende Pusteldecke entstand. Der Verlauf der Impfpockenbildung war normal. 6 Tage nach der Impfung wurden die Pusteln mit einem scharfen Löffel abgenommen. Vor der Abnahme wuschen wir das mit Kot und Streu verunreinigte Impffeld mehrmals mit Seife in der bekannten Weise, bis die Impffläche sauber erschien. Die abgenommene Vaccinepulpa wurde sofort bei $-20°$ C eingefroren und dann auf eine Verunreinigung mit ECBO-Viren untersucht. Das Ergebnis überraschte sehr. In keiner Dermovaccineprobe ließ sich ECBO-Virus nachweisen. Die Titer des Vaccinevirus lagen zwischen $10^{6,5}$ und $10^{7,2}$ Ei-ID_{50}. Der bakterielle Keimgehalt der gewonnenen Pockenimpfstoffe, der sich in keiner Weise bezüglich der Keimarten von dem gewohnten Bilde bei Pockenimpfstoffen unterschied, schwankte zwischen 10000—100000 Keimen, was darauf hinweist, daß das Impffeld intensiv verunreinigt wurde.

Den gleichen Versuch wie oben wiederholten wir bei vier Jungrindern im Alter zwischen 10—12 Monaten. Die Tiere wurden wieder über das Trinkwasser mit ECBO-Virusstamm 93 infiziert. 24 Std danach schieden drei Tiere ECBO-Virus im Kot aus. Beim letzten Tier begann die Kotausscheidung erstmals nach 4 Tagen. Die Animpfung der Pockenlymphe erfolgte 2 Tage nach der Virusfütterung, die Ernte 5 Tage später. Der Verlauf der Pockenherdbildung war normal. Während der Pockeninfektion hatten drei Tiere also mindestens 5 Tage und ein Tier nur 3 Tage lang ECBO-Virus im Kot ausgeschieden. Sämtliche Pockenimpfstoffe von den vier Tieren wurden mehrmals auf eine Verunreinigung mit ECBO-Viren untersucht. Mit keiner Methode gelang es, aus irgendeiner Probe ECBO-Virus zu isolieren.

Die Versuche zeigen, daß sich das ECBO-Virus, Stamm 93, in der Haut von Rindern nicht vermehren kann, auch wenn es über eine Verunreinigung mit Kot, Einstreu usw. auf das scarifizierte Impffeld gelangt. Da die Erreger nicht in die vaccinevirusinfizierte Hautzelle eindringen, lassen sie sich durch eine mechanische Reinigung des Impffeldes mit Seife leicht entfernen. In einem Versuch überprüften wir eine Vaccinepulpa, die aus einem Impffeld gewonnen wurde, das vor der Abnahme nicht gereinigt und deshalb noch mit Kot usw. verschmutzt war. Wie aus dem Kot, konnte auch aus diesen Proben ohne Schwierigkeiten ECBO-Virus isoliert werden. Der Versuch beweist zusammen mit den zahlreichen, positiven Kotuntersuchungen nicht nur die Sicherheit der angewandten Isolierungstechnik, sondern gleichzeitig auch, daß eine Verunreinigung von Pockenimpfstoff mit ECBO-Viren nur mechanisch über eine Kot- oder Einstreuverschmutzung möglich ist, die durch die bewährten Impfverbände und die Reinigungs- und Desinfektionsverfahren vor der Abnahme des Impfstoffes sicher verhindert werden kann. Bei den zwei Kälbern war die Pockenimpffläche 6 Tage lang einer ständigen Verschmutzung mit ECBO-virushaltigem Kot und bei den vier Rindern ebenfalls mindestens 3—5 Tage lang ausgesetzt. Trotzdem kam es in keinem Falle zu einer Ansiedlung und Vermehrung von ECBO-Viren im Impfbezirk.

Besprechung der Ergebnisse

Nachdem bekannt ist, daß gesunde Jungrinder sehr häufig ECBO-Viren beherbergen und im Kot ausscheiden, mußte bei der weiten Verbreitung der ECBO-Viren mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß diese Viren bei Herstellung von Pockenimpfstoffen vom Rind in den Impfstoff gelangen können. Es wurden deshalb insgesamt 61 Pockenimpfstoffe des In- und Auslandes auf eine Verunreinigung mit ECBO-Viren untersucht. Da alle getesteten Proben negativ ausfielen, dachten wir zuerst an eine Interferenz zwischen dem Vaccine- und ECBO-Virus.

Die experimentellen Befunde zu diesem Problem bewiesen aber, daß zwischen den beiden Viren keine Interferenz besteht.

Von zwei colostrumfrei aufgezogenen Kälbern und vier Jungrindern, die alle mindestens mehrere Tage ECBO-Virus im Kot ausschieden, hergestellte Pockenimpfstoffe enthielten ebenfalls kein ECBO-Virus als Verunreinigung. Da bei keinem Tier während der Pockenherdbildung ein Impfverband angelegt worden war, hatte der ECBO-virushaltige Kot genügend Gelegenheit, das Impffeld zu verunreinigen. Trotzdem kam es in keinem Falle zu einer Vermehrung von ECBO-Viren in den vaccineinfizierten Hautbezirken. Aus Vergleichsuntersuchungen und Kontrollen muß geschlossen werden, daß sich das ECBO-Virus in den Epithelschichten der Haut des Rindes nicht vermehren kann. Damit ist die Hauptgefahr einer Verunreinigung von Pockenimpfstoffen durch ECBO-Viren praktisch beseitigt. Denn nur eine Vermehrung von ECBO-Viren im Impfbezirk wäre wirklich gefährlich. Haftet mit dem Kot ausgeschiedenes ECBO-Virus ähnlich dem üblichen Stallschmutz nur mechanisch außen der Impffläche an, ohne in die vaccineinfizierten Hautzellen einzudringen und ohne sich dort zu vermehren, so kann eine derartige Verunreinigung des Impfstoffes durch die üblichen Impfverbände und durch die Wasch- und Desinfizierungsmaßnahmen vor der Impfstoffabnahme verhindert werden. Daß dies in der Praxis möglich ist, beweisen nicht nur die negativen 61 Impfstoffchargen von Impfstoffgewinnungsanstalten des In- und Auslandes, sondern auch die negativen Befunde bei den Pockenimpfstoffen, die von nachweislich ECBO-Virus ausscheidenden Rindern hergestellt worden waren.

Die Gefahr, daß über den Blutweg ECBO-Virus in den Impfstoff gelangen könnte, scheint ebenfalls nicht groß zu sein. Bei einem colostrumfrei aufgezogenen Kalbe kam es 48 Std nach der künstlichen Infektion des Tieres über das Trinkwasser zu einem signifikanten Temperaturanstieg. Zur gleichen Zeit impften wir das Tier cutan auf die rasierte und scarifizierte Haut der Inguinalgegend mit Vaccinevirus. Auch der in diesem Versuch gewonnene Pockenimpfstoff war frei von ECBO-Viren.

Da sich das ECBO-Virus anscheinend nicht in der Haut des Rindes vermehren kann, ist die Chance, daß es sich bei der Schnittimpfung des Menschen in der menschlichen Haut vermehrt, noch geringer zu beurteilen.

Es sollte jedoch weiter geprüft werden, in welchem Umfange nicht zu den Enteroviren gehörende Virusarten, die vom Rinde mit dem Kot oder mit dem Speichel, Nasen- und Rachensekret ausgeschieden werden, Pockenimpfstoffe verunreinigen können. Besonders gefährlich sind die Virusinfektionen des Rindes, die zu latenten oder klinisch inapparenten Verlaufsformen neigen. Dabei ist auch die Frage wichtig, wieweit diese Erreger über den Blutweg in den Impfstoff gelangen können, z. B., wenn sich die Tiere während der Impfstoffgewinnung gerade in der Inkubation

Tabelle 3. *Beim Rind vorkommende Virusarten*

Gruppe I: Viren, von denen bekannt ist, daß sie beim Menschen Erkrankungen hervorrufen können.

Gruppe II: Viren, die sehr leicht bei einer Herstellung des Pockenimpfstoffes vom Rind in die Pockenlymphe gelangen können. Über Erkrankungen beim Menschen durch sie ist bisher nichts bekannt.

Gruppe III: Für die Pockenimpfstoffherstellung vom Rind weniger wichtige Rinderviren.

Gruppe	Virusart	Krankheit	Vorkommen klinisch inapp. oder latenter Infektionen	wichtigste Ausscheidungswege
I	Adenovirus (Stamm 10 u. 19)	?	latente Infektion	*Kot*
	Aujeszky-Virus	Pseudowut		Nasen- und Rachensekret
	Bovines Encephalomyelitis-Virus (Miyagawanella)	Pneumonie, Encephalomyelitis, Durchfall	häufig klinisch inapparent und latent	*Kot*
	Kuhpockenvirus	Pocken der Rinder		Hautveränderungen, Nasen- und Speichelsekret?
	Lumpy-skin-Virus	Hautkrankheit (intradermale Knoten), vereinzelt auch Befall des Digestions- und Respirationstraktes	?	?
	Maul- und Klauenseuchevirus	Maul- und Klauenseuche		*Kot*, Urin, Milch, Speichel, Haut- und Schleimhautveränderungen
	Myxovirus Para-Influenza 3	Respiratorische Erkrankung	häufig klinisch inapparent, vielleicht auch latente Infektion	Nasen- und Rachensekret
	Poliomyelitisvirus (Typ I)			*Kot*
	REO-Viren	?	?	Kot, Nasen-Rachensekret
	Stomatitis papulosa-Virus	Stomatitis papulosa	die Regel	Nasen-Rachensekret, Schleimhautveränderungen

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Gruppe	Virusart	Krankheit	Vorkommen klinisch inapp. oder latenter Infektionen	wichtigste Ausscheidungswege
I	Stomatitis vesicularis-Virus	vesiculäres Exanthem in der Maulhöhe, weniger an Haut u. Klauen		*Kot*, Urin, Nasen- und Rachensekret
	Tollwutvirus	Tollwut		Speichel
	Vaccinevirus	lokale Pocken der Rinder		Hautveränderungen
	Zecken-Encephalitisvirus (Frühsommermeningoencephalitis)		klinisch inapp. Infektion (virämisches Stadium ohne Symptome)	Milch, *Kot*? (Überträger ist ixodes ricinus, ixodes persulcatus)
II	ECBO-Viren	?	meist latente Infektion	*Kot*, Nasen-, Rachensekret
	Diarrhöe-Viren	Enteritis bes. bei Jungtieren	häufig klinisch inapparent	*Kot*, Nasen- und Rachensekret
	Miyagawanella bovis	Durchfall, Aborte	häufig klinisch inapparent und latent	*Kot*
	Pneumo-Enteritis-Virus	Respiratorische Erkrankung bes. beim Jungtier	?	*Kot*, Nasen- und Rachensekret
	Rhinotracheitis-Virus	akute Erkrankung der oberen Luftwege	klinisch inapp. Formen kommen vor	Nasensekret, Augensekret
	Rhinovirus	akute Erkrankung der oberen Luftwege	klinisch inapp. Formen kommen vor	Nasen- und Augensekret
	Rinderpest	Rinderpest	klinisch inapp. Infektionen bekannt	Urin, Nasen-Rachensekret
III	Blue tongue-Virus	?	wird vermutet	Übertragung durch Culicoides-Arten
	Exanthema coitale vesiculosum-Virus	Bläschenausschlag (Geschl.-erkrankung)	klinisch inapp. Formen kommen vor	Schleimhäute des Genitaltraktes
	Kälber-Nieren-Virus	?	?	
	Leukose-Virus	Rinderleukose	?	?
	Papillom-Virus	Papillomatose		
	Vaginitis-Virus	Vaginitis		Schleimhäute des Genitaltraktes

befinden. Von Maul- und Klauenseuche (MKS)-infizierten Rindern hergestellter Pockenimpfstoff enthält z. B. das MKS-Virus in großen Mengen. Es wird wie das Vaccinevirus durch Glycerin konserviert und bleibt im Impfstoff ständig infektiös. Bei Impfstoffpassagen von Kalb zu Kalb wird das MKS-Virus mit dem Vaccinevirus laufend weitervermehrt. Eine Interferenz zwischen beiden Viren besteht nicht. Einmal in einen Lebendimpfstoff gelangtes Fremdvirus kann über viele Passagen, sofern es sich am Impfort vermehrt, ein ständiger Begleiter sein[13].

In der Tab. 3 sind die wichtigsten beim Rinde vorkommenden Virusarten zusammengestellt.

Besonders hingewiesen sei auf Rinder-Virusstämme, die den *REO*-[15] und *Adenoviren*[11,12] nahestehen. Offen bleibt auch die Rolle einiger noch wenig erforschter *Diarrhöe*-Viren des Rindes. Sie vermehren sich in Zellkulturen teils ohne cytopathogenen Effekt, teils zeigen sie nur eine geringe zellzerstörende Wirkung[7,8]. Auch die Bedeutung der weitverbreiteten *Miyagawanellen* wäre zu untersuchen. Bis zu 60% aller untersuchten Kälber dürften diese Erreger der Psittakosegruppe ausscheiden[16]. In Süddeutschland reagierten nach den Untersuchungen von Bögel u. Korn etwa 50% der Rinder serologisch positiv[3]. Da Miyagawanellenstämme vom Rind bei — 20° C relativ instabil sind, ist jedoch kaum damit zu rechnen, daß Handelsimpfstoffe Miyagawanellen enthalten. Schließlich sei noch die *Stomatitis papulosa* des Rindes erwähnt, eine Infektion, die viel häufiger vorkommt, als man gewöhnlich annimmt. Die Krankheit wird klinisch oft erst dann manifest, wenn resistenzmindernde Faktoren dazukommen. Aufmerksam wurde man hierauf im Zusammenhang mit den bei Chlornaphthalinvergiftungen gemachten Erfahrungen. Da das Virus anscheinend bevorzugt in der Haut und in den Schleimhäuten sitzt, kann es als Fremdvirus leicht in Impfstoffe gelangen, die über die Haut des Rindes gewonnen werden.

Zusammenfassung

61 untersuchte Pockenimpfstoffe des In- und Auslandes waren frei von ECBO-Viren.

In Pockenimpfstoffen, die von sechs ECBO-Virus ausscheidenden Jungtieren (zwei colostrumfrei aufgezogene Kälber und vier Jungrinder) hergestellt worden waren, konnten ebenfalls mit keiner Methode ECBO-Viren nachgewiesen werden.

Zwischen dem Vaccine- und ECBO-Virus besteht in empfänglichen Zellen keine Interferenz. Da sich das ECBO-Virus aber anscheinend nicht in Rinderhaut-Epithelzellen vermehren kann, ist die Gefahr einer Verunreinigung von Pockenimpfstoffen mit ECBO-Viren bei Anwendung von Impfverbänden und entsprechenden Reinigungsverfahren vor der Impfstoffabnahme nicht gegeben.

Literatur

[1] Behrens, B.: Die Auswertung der Digitalisblätter im Froschversuch. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **140**, 327 (1929).

[2] Bögel, K., u. A. Mayr: Untersuchungen über die Chloroformresistenz der Enteroviren des Rindes und des Schweines. Zbl. Vet.-Med. **8**, 908 (1961).

[3] Bögel, K., G. Korn u. R. Lorenz: Vergleichende Untersuchungen über die Bedeutung verschiedener Virusarten bei respiratorischen Erkrankungen der Rinder. Mh. Tierheilk. (im Druck).

[4] Committee on the Enteroviruses, National Foundation for infantile Paralysis. The enteroviruses. Amer. J. publ. Hlth. **47**, 1556 (1957).

[5] Dulbecco, R.: Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **38**, 747 (1952).

[6] Dulbecco, R., and M. Vogt: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. exp. Med. **99**, 167 (1954).

[7] Gillespie, J. H., and J. A. Baker: Studies on virus diarrhea. Cornell Vet. **49**, 439 (1959).

[8] Gillespie, J. H., L. Coggins, J. Thompson and J. A. Baker: Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease. Cornell Vet. **51**, 155 (1961).

[9] Herrlich, A., u. A. Mayr: Pockenimpfstoff aus Zungengewebekulturen vom Rind. Arch. Virusforsch. (Wien) **7**, 284 (1957).

[10] Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **162**, 480 (1931).

[11] Klein, M., E. Earley and J. Zellat: Isolation from cattle of a virus related to human adenovirus. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **102**, 1 (1959).

[12] Klein, M., J. Zellat and Th. C. Michaelson: A new bovine adenovirus related to human adenovirus. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **105**, 340 (1960).

[13] Mayr, A.: Zur Epidemiologie und Epizootologie der Viruskrankheiten. III. Teil. Mh. Tierheilk. **10**, 178 (1958).

[14] Mayr, A., u. K. Bögel: Der Chloroform-Resistenztest zur Isolierung und Charakterisierung von Enteroviren. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **182**, 564 (1961).

[15] Moscovici, C., M. La Placa, J. Maisel and H. Kempe: Studies of bovine enteroviruses. Amer. J. vet. Res. **22**, 852 (1961).

[16] York, C. J., and J. A. Baker: Miyagawanella bovis infection in calves. Ann. N. Y. Acad. Sci. **66**, 210 (1956).

[17] Youngner, J. S.: Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **85**, 202 (1954).

Prof. Dr. A. Mayr,
Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere,
74 Tübingen, Waldhäuserhöhe

Zeitschrift f. Hygiene 148, 296–306 (1962)

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen
und aus der Bayerischen Landesimpfanstalt München

Reaktivierung zwischen Vaccine- und Variolavirus

Von
HELMUT MAHNEL*

(Eingegangen am 15. Januar 1962)

Nimmt eine Wirtszelle zwei verschiedene Viren auf, von denen eines wärme-inaktiviert ist, können bei der Reproduktion vermehrungsfähige Partikeln beider Partner entstehen. Voraussetzung ist, daß der genetische Apparat des „inaktivierten" Virus nicht geschädigt ist. Ferner müssen beide Viren derselben Untergruppe oder Species angehören. Dieses von BERRY u. DEDRICK[1] beim Kaninchenfibrom- und -myxomvirus entdeckte, neuerdings von KILHAM[17] wieder bestätigte und auch bei Phagen[18] beschriebene Phänomen wird als Reaktivierung bezeichnet. Der früher gebrauchte Begriff Umwandlung (des lebenden Virus durch das inaktivierte) wurde fallengelassen.

Die Reaktivierungsmöglichkeiten innerhalb der Pockengruppe wurden von FENNER, JOKLIK u. Mitarb.[8,14,15] sowie HANAFUSA u. Mitarb.[10,11] weitgehend mit Erfolg untersucht. JOKLIK u. Mitarb.[13] gelang im Rahmen dieser Untersuchungen auch der Beweis ihrer Hypothese, daß das inaktivierte Virus mit seinem unversehrten genetischen Anteil nicht ein vollaktives verwandtes Virus zur Reaktivierung benötigt, sondern nur sein nichtgenetisches Material. Bei gleichzeitiger Verimpfung von Viruspartikeln einer Kaninchenpockenmutante, deren DNS mit di(2-chloräthyl)-methylamin inaktiviert worden war, und wärme-inaktivierten Einheiten einer anderen Mutante auf die Chorioallantoismembran konnte eine Reaktivierung von letzteren nachgewiesen werden. Bei den Pockenviren gelangen Reaktivierungen unter Varianten, zwischen verschiedenen Species und auch zwischen Vertretern verschiedener Untergruppen.

Bei der Reaktivierung zwischen Pockenvertretern, wo zwei eng verwandte Viren in einer Zelle gleichzeitig zur Reproduktion kommen, sind auch „Kreuzungen" durch Austausch von genetischem Material möglich[5,7,9,26]. Dieses Phänomen wurde auch bei Phagen[2,4,19,22,23], beim Influenzavirus[3] und beim Herpesvirus[24] beschrieben. Die Produkte mit neuen Merkmalzusammensetzungen bezeichnet FENNER als Rekombinanten, wenn sie zwischen Varianten derselben Species zustande kommen (verschiedene Vaccinevirusstämme), als Hybriden, wenn verschiedene Species

* Herrn Professor Dr. A. HERRLICH zum 60. Geburtstag gewidmet.

einer Untergruppe (Vaccine, Kuhpocken, Ektromelie) Merkmale austauschen. Erstere sollen häufiger, letztere sehr selten entstehen.

Der Nachweis von Rekombinanten zwischen Varianten einer Species wird erschwert durch die nahe Verwandtschaft der Erreger. Man kann deshalb nur Virusstämme heranziehen, die eine Zahl von verschiedenen, stabilen und differenzierbaren Eigenschaften haben, an denen die Ausgangsviren und geglückte Rekombinanten erkannt werden können. Fenner[6] charakterisierte die von ihm verwendeten Stämme vor den Versuchen an Hand verschiedener Eigenschaften und Merkmale. Des weiteren ist es oft nicht möglich, bei der Reaktivierung eines weniger virulenten inaktivierten Virus durch ein virulenteres, sich rascher vermehrendes Virus den Nachweis zu führen, da das Reaktivierte von dem Reaktivierenden gleichsam überwuchert wird.

Die Reaktivierbarkeit ist eine Eigenschaft, die zum Studium der Verwandtschaft innerhalb der Pockengruppe angewandt werden kann. Gelingt sie mit Viren zweier Pockenarten in einem Zellsystem, darf weiterhin angenommen werden, daß das betreffende Gewebe für beide Viren voll empfänglich ist. Die Verhältnisse innerhalb der Pockengruppe wurden von vorgenannten Autoren weitgehend geklärt. Das Variolavirus wurde jedoch noch in keine Versuche einbezogen. Untersuchungen über einige Reaktivierungsmöglichkeiten zwischen Variola- und Vaccinevirus werden in der nachfolgenden Mitteilung beschrieben. Als Wirtssystem dienten HeLa-Zellkulturen, die Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereies und die saugende Maus. In allen drei Systemen vermehren sich beide Viren gut und sind zudem in HeLa-Kulturen an Hand des cytopathogenen Effektes und auf der Chorioallantois in den Membranveränderungen voneinander differenzierbar. Ferner prüften wir die Reaktivierbarkeit des Vaccinevirus in der Kaninchenhaut. Die Versuche hatten im Rahmen unserer Arbeiten zusätzliche Bedeutung in bezug auf Wirtsspektrum und Wandlungsmöglichkeiten des Variolavirus.

Material und Methodik

Abkürzungen. VE = infektiöse Einheiten; IVE = inaktivierte Einheiten (nach Herd-bildenden Einheiten des Ausgangsmaterials auf der CAM berechnet); CAM = Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereies; EKM = Kultur von embryonalen Kälbermuskelzellen; iMP = infantile Mäusepassage; cpE = cytopathogener Effekt; RAF = Rinderamnionflüssigkeit; Vr = Variolavirus, Vc = Vaccinevirus (in Tabellen).

Virusstämme. Als Vaccinevirus wurde der Impfstoffstamm *Bern* herangezogen. Grob bei 1000 UpM/min abzentrifugiertes Virusmedium (TCM 199 + 2% Kälberserum) der 5. EKM-Passage diente als Ausgangssuspension. Ihr Virusgehalt lag bei 10^7/ml.

Alles Variola-Virusmaterial ging auf den Stamm Bombay 1958 zurück. Für die Gewebekulturversuche zogen wir Virusmedium der 3.—4. HeLa-Passage heran,

desgleichen für einen Teil der Kaninchenversuche. In den Versuchen an infantilen Mäusen benutzten wir adaptiertes Virus der 44. und 45. direkten iMP (i. p.). Das gleiche Virus der 40. iMP lief auch am Kaninchen und in einem Versuch auf der CAM. Im zweiten Eiversuch kam Virus der 95. direkten Eipassage zur Anwendung.

Inaktivierung. Bei Verwertung der Erfahrungen von KAPLAN[16] und WOODROOFE[25] wurde nur Virusmaterial inaktiviert, das frisch entnommen oder bei −60° C gelagert worden war. Jede Probe prüften wir am Ei auf Inaktivität und setzten im Versuch entsprechende Kontrollen an. Die Inaktivierungszeit lag bei 3—5 Std unter einer Temperatur von 56° C. Aus allen untersuchten Proben der verwendeten Materialien konnte kein vermehrungsfähiges Vaccine- bzw. Variolavirus mehr isoliert werden.

Gewebekulturen. Die Kulturen wurden von trypsinierten HeLa-Zellen in Vierkantflaschen nach BREED-DEMETER angesetzt. Als Erhaltungs- und Virusmedium diente reine RAF. Das Animpfmaterial wurde jeweils nach 3 Std Inkubation entfernt und die Kulturen vor der Zugabe des Erhaltungsmediums dreimal gut gewaschen.

Ei- und Tiermaterial, Impftechnik. *Bruteier:* 11 Tage vorbebrütete Hühnereier wurden mit 0,1 ml Inokulum auf die gesenkte CAM beimpft und 3 Tage bei 37° C nachbebrütet. Sollte reaktiviertes Variolavirus erfaßt werden, betrug die Nachbebrütungstemperatur 35° C.

Infantile Maus. In Babymäusen vermehren sich Vaccine- und Variolavirus sehr gut[12,21]. Die i.p. Infektionen wurden an 1 Tag alten Tieren mit 0,1 ml vorgenommen. Für die i.cer. Impfungen zogen wir 3—4 Tage alte Babymäuse heran, welche ca. 0,03 ml erhielten. Erkrankte Tiere wurden am 8. Tag p.i. getötet, soweit sie nicht schon vorher verendet waren, der Rest am 14. Tag p.i. Die Organe wurden auf Virus geprüft. Bei den i.p. infizierten Mäusen waren dies Lunge, Leber, Nieren und Milz, bei den i.cer. infizierten die Gehirne.

Kaninchen. Hier wurde die intracutane Impftechnik nach GROTH angewandt, wobei mit 0,1 ml eine Quaddel in die enthaarte Rückenhaut gesetzt wird. Veränderte Haut- und Unterhautbezirke wurden am 5. Tag p.i. abgenommen und ebenfalls auf Virus geprüft.

Nachweismethoden. Der Nachweis der spezifischen Viruseigenschaften wurde stets im bebrüteten Hühnerei geführt, wo Variola- und Vaccinevirus einwandfrei differenziert und charakterisiert werden können. In Zweifelsfällen wurden Subpassagen angelegt, insbesondere wenn einer der beiden Erreger rein zu isolieren war. Die Differenzierung in HeLa-Kulturen an Hand der cytopathogenen Effekte wurde mit herangezogen, da deutliche Unterschiede heraustreten[20].

Ergebnisse

HeLa-Kulturen. Die Reaktivierung von inaktiviertem Vaccinevirus durch infektionstüchtiges Variolavirus gelang in drei von vier Versuchen. Die positiven Resultate waren zum Teil in typischen Vaccineeffekten erkennbar oder deuteten sich in Mischeffekten an. In den Kontrollkulturen trat der variolatypische Effekt am 2. Tag p.i. heraus, die Vaccineeffekte waren meist schon einige Stunden früher eindeutig. Zum Unterschied hiergegen zeigten sich die cpE der reaktivierten Vaccineeinheiten in den Versuchskolben erst später, je nach Infektionsstärke am 3.—4., zum Teil sogar erst am 6. Tag p.i., während das reaktivierende Variolavirus stets schon am 2. Tag im cpE zu erkennen war. Die Isolierung des reaktivierten

Virus wurde nach dem Erscheinen seines cpE in der Regel am 3. Tag p.i. aus einer Mediumprobe versucht. Regelmäßig wurde die Eianzüchtung am 6. oder 7. Tag p.i. wiederholt. Bis zur totalen Kulturzerstörung überdeckte meist der cpE des Vaccinevirus den des Variolavirus völlig. Im Versuch I gelang die Reaktivierung nicht. Es ist aber auch möglich, daß hier die starke Variolavermehrung wenige reaktivierte Vaccineeinheiten überdeckte. In den drei anderen Versuchen sicherte der Ei-Kulturversuch das Resultat. Ein quantitativer Vergleich der verschiedenen cpE in der HeLa-Kultur und der CAM-Veränderungen nach der Anzüchtung der ins Medium eluierten Viruseinheiten deutete an, daß die Zahl der reaktivierten Vaccineviren mit der Konzentration des reaktivierenden Variolavirus anstieg.

Bei der umgekehrten Reaktivierung des Variolavirus durch das Vaccinevirus war der Nachweis auf der CAM schwierig, da sich das Vaccinevirus in der Kultur schneller vermehrt, wahrscheinlich stärker eluiert wird und so die Veränderungen des Variolavirus überdeckt. In zwei von vier Ansätzen hoben sich am Zellrasen einige deutliche Variolaeffekte ab, die Eiisolierung gelang jedoch nicht. Im vierten Versuch, bei dem wir mit sehr niedrigen Vaccinedosen arbeiteten, konnte Variolavirus aus dem Virusmedium am 4. Tage p.i. über einige CAM-Subpassagen reinisoliert werden.

In Tab. 1 sind die Versuche in HeLa-Kulturen zusammengefaßt.

Chorioallantoismembran. Die Reaktivierung von inaktivierter Vaccine durch Variolavirus gelang ohne Schwierigkeiten (Tab. 2). Durch Subpassagen herausgeschnittener, isoliert stehender Herde wurde der Nachweis gesichert. Die CAM-Veränderungen der reaktivierten Einheiten waren typisch im Aufbau, jedoch kleiner und flacher als die Herde des Ausgangsstammes vor der Reaktivierung. Das Verhältnis von reaktivierten Vaccineeinheiten zur Variola lag um 1:10 bis 1:100. Aus diesem Grunde schlossen wir keine umgekehrten Versuche zur Reaktivierung von Variola an, da sich letzteres Virus am Ei deutlich schlechter vermehrt und bei diesem Reaktivierungsverhältnis zu erwarten war, daß die Variolaherde von den Veränderungen des reaktivierenden Vaccinevirus überdeckt werden würden.

Infantile Maus. Nach *intraperitonealer* Verimpfung der Reaktivierungsgemische (virulentes Variolavirus, inaktiviertes Vaccinevirus) konnten wir keine Reaktivierung nachweisen (Tab. 4). Die Isolierung von Vaccinevirus aus den Mäuseorganen gelang nicht. Wir müssen annehmen, daß die Reaktivierung nach i.p. Impfung nicht möglich ist. Das Vaccinevirus ist für die saugende Maus dieses Alters sehr stark pathogen, die Infektionsrate nahezu 100%. Das Virus vermehrt sich stark und wäre sicher bei positivem Ergebnis in Erscheinung getreten. Das negative Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, daß das eingebrachte Reaktivie-

Tabelle 1. *Reaktivierungsversuche in HeLa-Kulturen*

Versuch Nr.	inaktiviertes, zu reaktivierendes Virus			Reaktivierendes Virus	Cytopathogener Effekt* bei Einsaat von ... reaktivierenden Viruseinheiten pro Kultur						Befund bei Anzucht und Isolierung auf CAM	Erfolg
		Dosis pro Kultur	Inakt.Zeit b. 56° C		10–20	um 50	100–200	500–1000	10000	100000		
1	Vaccine	$10^{6,5}$ IVE	3 Std	Variola				Vr +++	Vr +++		rein Vr	–
2	Vaccine	$10^{6,5}$ IVE	3 Std	Variola			±	Vc + Vr + Vr:Vc = 1:1	Vr + Vc ++ Vr:Vc = 1:9	Vc +++ Vr ±	Vr ab 2. Tag, Vc am 6. Tag isoliert; Verhältnis wie cpE	+
3	Vaccine	$10^{6,5}$ IVE	3 Std	Variola			Vr(±)	Vr + Vc(±)	(+++)		Am 10. Tag Vr u. wenig Vc	+
4	Vaccine	$10^{6,5}$ IVE	4 Std	Variola	10 Vr 4 Vc (ab 4. Tg.)	30 Vr ca. 50 Vc 3. Tag	ca. 100 Vr ca. 150 Vc (ab 3. Tg.)				Vc ab 3. Tag dominierend	+
5	Variola	$10^{6,5}$ IVE	3 Std	Vaccine		Vc +	Vc +	Vc ++			Nur Vc erkennbar	–
6	Variola	$10^{6,5}$ IVE	3 Std	Vaccine		Vc + (20 Vr)		Vc ++ Vr +			Vr-Isolierung gelang nicht Vc überwächst	– (±)
7	Variola	$10^{6,5}$ IVE	3 Std	Vaccine	Vc + 3 Vr	Vc + Vr ∅	Vc + Vr ∅				Vr-Isolierung gelang nicht Vc nicht rein?	– (±)
8	Variola	$10^{6,5}$ IVE	4 Std	Vaccine	Vc + 1 Vr 6. Tag	Vc + 3 Vr	Vc + 8 Vr				Vc dominierend Vr nach Verdünnung u. 3 Subpassagen isoliert	+

* = Stärke des cpE in ± bis +++ abgestuft; ( ) = nicht eindeutig; arabische Zahl = Einzelherde.

Tabelle 2. *Reaktivierung auf der CAM des bebrüteten Hühnereies*
Vaccine-Inaktivierung 5 Std/56° C

Versuch	Zu reaktivierendes Vaccinevirus Dosis pro CAM	Reaktivierendes Variolavirus	Dosis/CAM	CAM-Bild	Isolierung
1a	EKM-Virusmedium $10^{6,7}$ IVE	Organverreibung der 40. iMP	10000 VE	Vr: konfluierend Vc: einzeln heraustretende Herde	
1b			1000 VE	Vr: dicht stehende Herde Vc: wenig heraustr. Herde*	* 2 Subpass.: Vc isoliert typische Herde
2a	EKM-Virusmedium $10^{6,7}$ IVE	CAM-Verreibung der 95. Eipassage	1000 VE	Vr: konfluierend Vc: nicht heraustretend	—
2b			100 VE	Vr: ca. 100 Einzelherde Vc: 3—10 Herde pro CAM*	* 2 Subpass.: typische Vaccineherde

Tabelle 3. *Reaktivierung im Gehirn der infantilen Maus*
Vaccine-Inaktivierung 5 Std/56° C

Versuch	Mäuse Zahl/Alter (Tage)	zu reakt. Vaccine Dosis/Tier	Reaktivierendes Variola	Dosis/Tier	Prüfung der Hirnverreibungen auf d. CAM	Isolierung
1	15/3	EKM-Virusmedium $10^{6,0}$ IVE	Organverreibung d. 44. i.p. iMP	ca. 100 bis 300 VE	*11. Tag p.i.* unverd.: Vr: 200 bis 500/CAM Vc: 30/CAM 1 : 10 Vr: 100/CAM Vc: 12/ CAM*	— * 1. Subpass.: makroskop. rein Vc
2	13/3	EKM-Virusmedium $10^{6,0}$ IVE	Organverreibung der 45. i.p. iMP	ca. 200 bis 500 VE	*11. Tag p.i.:* 1 : 1000 Vr: 100 bis 300/CAM Vc: 2—3/CAM* *15. Tag p.i.:* 1 : 10 Vr: 60 bis 100/CAM Vc: 2/CAM	* 1. Subpassage: Vc dominierend Vr einzeln —

rungssystem nicht direkt an den Ort der Virusvermehrung gelangte, die inaktivierten Einheiten daher keine oder zu geringe Möglichkeiten der gleichzeitigen Zelladsorption hatten.

Über die *intracerebrale* Infektion gelang die Reaktivierung in beiden Versuchen (Tab. 3). Über die CAM-Animpfung konnte aus den Hirnverreibungen Vaccinevirus einwandfrei isoliert werden. Ein Mengenvergleich

Tabelle 4. *Versuche zur Reaktivierung in der infantilen Maus nach intraperitonealer Infektion 1—2 Tage alter Mäuse*

Wurf Nr.	Tierzahl	Dosis an inakt. Vacc. pro Maus	Varioladosis pro Maus	Klinischer Verlauf	Virusnachweis aus den Organen auf der CAM
1	9	$10^{7,0}$ IVE*	Kontrolle	Alle Tiere überleben ohne Symptome	negativ
2	10	$10^{7,0}$ IVE**	Kontrolle	Alle Tiere überleben ohne Symptome	negativ
3	10	$10^{6,7}$ IVE*	500 VE	Alle Tiere überleben ohne Symptome	8. Tag: 2 Tiere neg. 14. Tag Rest: Leber u. Lunge schwach positiv, nur Vr
4	11	$10^{6,7}$ IVE*	50000 VE	6.—12. Tag p.i. schwere Erkrankg., 9 Tiere verenden, 2 überleben	verendete Tiere: um 10^4 VE/0,1 ml Vr Überlebende 19.Tg: negativ
5	11	$10^{6,7}$ IVE**	10 VE	Alle Tiere überleben ohne Symptome	negativ
6	10	$10^{6,7}$ IVE**	1000 VE	2 verenden bis 3. Tag, 8 überleben ohne Symptome	Überlebende 20.Tg. negativ
7	9	$10^{6,7}$ IVE**	100000 VE	3 verenden bis 8. Tag, 6 überleben nach mäßiger Erkrankung	Verendete Tiere: hoch positiv rein Vr Überlebende 20.Tg.: wenige Vr

Vaccine-Inaktivierung: * 3 Std./56°; ** 5 Std./56°.

der reaktivierenden Einheiten mit den reaktivierten, wie sie aus den Gehirnen isolierbar waren, soll nicht gezogen werden, da nicht bekannt ist, inwieweit jeweils schon eine örtliche Vermehrung stattgefunden hatte.

Kaninchen. Bei intracutaner Verimpfung auf das Kaninchen nach der Grothschen Methode vermehrt sich das Vaccinevirus sehr gut. Es bilden

Tabelle 5. *Versuche zur Reaktivierung am Kaninchen bei intracutaner Injektion* (nach GROTH)

Tier Nr.	Injektions-dosis		Inaktive Vaccine Dosis/Injekt.	Variola Dosis pro Injektion	Injekt.-Folge	Reaktion	Virusisolierung
1	links	5·0,1 ml	$10^{5,5}$IVE	$10^{5,5}$ VE * H	zusammen	ohne	5. Tag negativ
	rechts	5·0,1 ml	$10^{5,5}$IVE	10^{1}-10^{5}VE H*	zus.	ohne	
2	links	5·0,1 ml	$10^{5,5}$IVE	$10^{6,5}$ VE **	zus.	2.—5. Tag + + +-Infiltrate Entzündung mit Rötung und Area	nur ca. 100 VE Variola pro Infiltrat isolierbar
	rechts	5·0,1 ml	$10^{5,5}$IVE	10^{1}—10^{5} VE **	zus.	2.—5. Tag ± bis + +-Infiltrate Entzündung und Area, 5. Tag abgeheilt	
3	links	3·0,1 ml	$10^{6,0}$IVE **	$10^{6,5}$ VE **	Variola 3 Tage später	Rötung und leichte ± bis + Infiltrate am 2. Tag nach der Variolagabe, keine Reaktion nach inaktivierter Vaccine	negativ
	rechts	3·0,1 ml	$10^{6,0}$IVE	$10^{6,5}$ VE**		wie links	negativ
4	links	3·0,1 ml	$10^{6,0}$IVE	$10^{6,5}$ VE**	Variola 6 Tage später	+ bis + + Reaktionen 2.—5. Tag nach der Variolagabe, Entzündung mit hartem Infiltrat, keine Reaktion nach inakt. Vaccine	negativ
	rechts	3·0,1 ml	$10^{6,0}$IVE	$10^{6,5}$ VE**		wie links	negativ
5	links	3·0,1 ml	Kontrolle	$10^{5,5}$ VE* H		leichte Rötung bis 4. Tag	negativ
	rechts	3·0,1 ml	Kontrolle	$10^{5,5}$ VE* H		leichte Rötung bis 4. Tag	negativ
6	links	3·0,1 ml	$10^{6,0}$IVE	Kontrolle		ohne	negativ
	rechts	3·0,1 ml	Kontrolle	$10^{6,5}$ VE**		Reaktion bis 5. Tag, harte markante Infiltrate + + bis + + +	ca. 500 VE Variola pro Injektionsstelle isolierbar

Vaccine-Inaktivierung: 5 Std./56°C; * = HeLa-Virusmedium; ** = Organverreibung der 40.i.p. iMP; H = gleichzeitige Gabe von Hyase, entspricht 5 1E/Injektion.

sich Infiltrate, die bei stärkeren Konzentrationen nekrotisierend einschmelzen. Vaccinevirus ist hieraus in großen Mengen nachweisbar. Nach Einbringung von Variolavirus ist eine Vermehrung nicht nachweisbar, man kann im besten Falle einige überlebende Viruseinheiten rückisolieren.

Die Reaktivierungsversuche verliefen hier negativ (Tab. 5). Die Reaktionen der Haut, die wir nach Injektion von konzentrierten Variolasuspensionen erhielten, dürften mit unspezifischen toxischen Produkten in Zusammenhang stehen. Die Kontrollen mit inaktivierter Vaccine allein verliefen reaktionslos. Auch bei Zugabe von Hyase (Hyaluronidase, Schering-Berlin) zu den Reaktivierungsgemischen und bei Nachimpfung in die gleichen Hautbezirke am 3. oder 6. Tag nach der Vorinjektion der inaktivierten Vaccine blieben die Versuche erfolglos. Lediglich persistierende Variolaeinheiten waren isolierbar. Reaktivierte Vaccineeinheiten hätten sich in den beschriebenen deutlichen Reaktionen bemerkbar gemacht.

Besprechung der Ergebnisse

Die gelungene Reaktivierung von wärme-inaktiviertem Vaccinevirus mit dem Variolavirus liegt in dem Rahmen der bei den anderen Viren der Pockengruppe gewonnenen Erkenntnisse. Das relativ günstige Reaktivierungsverhältnis, das sich in den HeLa-Kulturversuchen und den CAM-Testen ergab, weist auf die enge Verwandtschaft der beiden Erreger hin. In den HeLa-Versuchen trat das reaktivierte Vaccinevirus je nach der Intensität der Reaktivierung gegenüber den Kontrollen verzögert in Erscheinung. Nur in diesem System konnte auch eine Reaktivierung von inaktiviertem Variolavirus durch Vaccinevirus nachgewiesen werden, doch dürfte sie auch in anderen für beide Viren voll empfänglichen Zellen eintreten. Auf die Nachweisschwierigkeiten wurde von früheren Untersuchern bereits hingewiesen. In dem kleinen Rahmen unserer Versuche und der einfachen Methodik der Charakterisierung von Variolavirus und Vaccinevirus traten keine Änderungen der typischen Merkmale beider Viren heraus. Die Tatsache jedoch, daß die Reaktivierung leicht gelingt und beide Erreger sich innerhalb der Pockengruppe sehr nahe stehen, zeigt bei Heranziehung der Erkenntnisse von FENNER u. Mitarb. — Möglichkeit der Entstehung von Rekombinanten oder Hybriden — immerhin auf, daß ein Weg zur Entstehung von heterogenem Virusmaterial und Varianten beider Pockenviren gegeben ist. Ein an Variolois Erkrankter frisch Vaccinierter z. B. hat beide Viren aufgenommen und bietet ihnen optimale Zellsysteme zur gleichzeitigen Vermehrung und gegebenenfalls, wenn auch nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit, zur Reaktivierung bereits „inaktiver" Einheiten und „Kreuzung". Die vieldiskutierte „Umwandlung" von Variolavirus in Vaccinevirus sei in diesem Zusammenhang erwähnt.

In der Kaninchenhaut ergaben sich negative Resultate. Dies stützt den von älteren Autoren angezweifelten Befund, daß die Kaninchenhaut für Variolavirus nicht empfänglich ist.

Die Inaktivierung von Variola- und Vaccinevirus bei 56° C trat erst nach 2 Std verläßlich ein. Die von anderen Untersuchern angegebenen Zeiten reichten bei unseren Stämmen nicht aus.

Interferenzmöglichkeiten wurden im Rahmen der Versuche nicht verfolgt. Es ist jedoch anzunehmen, daß dieses Phänomen als mitbestimmender Faktor Einflüsse auf die Ergebnisse hatte.

Zusammenfassung

Variolavirus reaktivierte wärmeinaktiviertes Vaccinevirus in HeLa-Zellkulturen, auf der CAM des bebrüteten Hühnereies und nach i.cer. Impfung der infantilen Maus. Die umgekehrte Reaktivierung von inaktiviertem Variolavirus mit vermehrungsfähigem Vaccinevirus konnte nur in HeLa-Kulturen nachgewiesen werden. Versuche an i.p. infizierten Babymäusen und intracutan geimpften Kaninchen verliefen negativ. Veränderungen der für das bebrütete Hühnerei charakteristischen Merkmale beider Viren wurden bei den Reaktivierungen nicht beobachtet.

Literatur

[1] Berry, G. P., and H. M. Dedrick: A method for changing the virus of rabbit fibroma (Shope) into that of infections myxomatosis (Sanarelli). J. Bact. **31**, 50 (1936).

[2a] Bresch, C.: Genetical studies on bacteriophage T 1. Ann. Inst. Pasteur **84**, 157 (1953).

[2b] Bresch, C.: Recombination in bacteriophage. Ann. Rev. Microbiol. **13**, 313 (1959).

[3] Burnet, F. M., and P. E. Lind: A genetic approach to variation in influenza viruses. J. gen. Microbiol. **5**, 59 (1951).

[4] Dulbecco, R.: A critical test of the recombination theory of multiplicity reactivation. J. Bact. **63**, 199 (1951).

[5] Fenner, F.: Genetic studies with mammalian pox viruses. II. Recombination between two strains of vaccinia virus in single HeLa cells. Virology **8**, 499 (1959).

[6] Fenner, F.: The biological characters of several strains of vaccinia, cowpox and rabbitpox viruses. Virology **5**, 502 (1958).

[7] Fenner, F., and B. M. Comben: Genetic studies with mammalian pox viruses. I. Demonstration of recombination between two strains of vaccinia virus. Virology **5**, 530 (1958).

[8] Fenner, F., and G. M. Woodroofe: The reactivation of the poxviruses. II. The range of reactivating viruses. Virology **11**, 185 (1960).

[9] Gemmel, A., and F. Fenner: Genetic studies with mammalian pox viruses. III. White (n) mutants of rabbit pox virus. Virology **11**, 219 (1960).

[10] Hanafusa, H., T. Hanafusa and J. Kamahora: Transformation phenomena in the pox group viruses. II. Transformation between several members of the pox group. Biken's J. **2**, 85 (1959).

[11] Hanafusa, T., H. Hanafusa and J. Kamahora: Transformation phenomena in the pox group viruses. I. Transformation of ectromelia into vaccinia virus in tissue culture. Biken's J. **2**, 77 (1959).

[12] Herrlich, A., u. A. Mayr: Pockenimpfstoff aus Zungengewebekulturen vom Rind. Arch. Virusforsch. (Wien) **7**, 284 (1957).

[13] Joklik, W. K., P. Abel and I. H. Holmes: Reactivation of poxviruses by non-genetic mechanism. Nature (Lond.) **186**, 992 (1960).

[14] Joklik, W. K., I. H. Holmes and M. I. Briggs: The reactivation of the poxviruses. III. Properties of reactivable particles. Virology **11**, 202 (1960).

[15] Joklik, W. K., G. M. Woodroofe, I. H. Holmes and F. Fenner: The reactivation of the poxviruses. I. Demonstration of the phenomen and techniques of assay. Virology **11**, 168 (1960).

[16] Kaplan, G.: The heat inactivation of vaccinia virus. J. gen. Microbiol. **18**, 58 (1958).

[17] Kilham, L.: Fibroma-myxoma virus transformation in different types of tissue culture. J. nat. Cancer Inst. **21**, 729 (1958).

[18] Luria, S. E.: Reactivation of irradiated bacteriophage by transfer of self-producing units. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **33**, 253 (1947).

[19] Luria, S. E., and R. Dulbecco: Genetic recombination leading to production of active bacteriophage from ultraviolet inactivated bacteriophage particles. Genetics **34**, 93 (1949).

[20] Mahnel, H., u. E. Munz: Differenzierung von Variola- und Vakzinevirus in HeLa- und Fl-Zellkulturen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **178**, 149 (1960).

[21] Mayr, A., u. A. Herrlich: Züchtung des Variolavirus in der infantilen Maus. Arch. Virusforsch. (Wien) **10**, 226 (1960).

[22] Murphy, J. S.: Recombination of mutant phages of bacillus megatherium 899 A. J. exp. Med. **98**, 657 (1953).

[23] Visconti, N., and M. Delbrück: The mechanism of genetic recombination in phage. Genetics **38**, 5 (1953).

[24] Wildy, P.: Recombination with herpes simplex virus. J. gen. Microbiol. **13**, 346 (1955).

[25] Woodroofe, G. M.: The heat inactivation of vaccinia virus. Virology **10**, 379 (1960).

[26] Woodroofe, G. W., and F. Fenner: Genetic studies with mammalian pox viruses. IV. Hybridization between several different pox viruses. Virology **12**, 272 (1960).

Dr. Helmut Mahnel,
Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere,
74 Tübingen, Waldhäuserhöhe

Zeitschrift f. Hygiene 148, 307—317 (1962)

Aus der Staatlichen Bakteriologischen Untersuchungsanstalt München
(Direktor: Dr. med. Bl. Freytag)

Orientierende Untersuchungen über das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gegen Coxsackieviren in der gesunden Bevölkerung* **

Von
Wolf Henigst***

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Januar 1962)

Die ersten Vertreter der Coxsackieviren wurden 1947 von Dalldorf u. Sickles aus den Stühlen von zwei paralytisch erkrankten Kindern isoliert[3]. Durch die Anwendung der neuen Technik, Virusisolierungen in Säuglingsmäusen vorzunehmen, gelang es bald, weitere Mitglieder dieser „Coxsackievirusfamilie"[1] zu entdecken. Im Jahre 1950 wurde das erste Virus der B-Gruppe isoliert[2]. Bedeutend erleichtert wurden die Arbeiten mit diesen Viren, nachdem Sickles u. Mitarb.[17,18] festgestellt hatten, daß eine Anzahl von Typen einen cytopathischen Effekt in Gewebekulturen hervorruft. Die Virustypen A9 und B1 mit B5 vermehren sich unter Zerstörung der Zellen vorzüglich in Gewebekulturen von trypsinierten Affennieren und nehmen damit eine Sonderstellung unter den 30 augenblicks veröffentlichten Coxsackievirustypen ein+.

Die klinische Bedeutung der sechs obigen Typen beschränkt sich offensichtlich nicht nur auf die gelegentliche Verursachung des bekannten Syndromes der gutartigen aseptischen Meningitis und der fieberhaften Erkrankung mit Pharyngitis. Die Typen B1—B5 treten ferner häufig als Erreger der Pleurodynie auf, und einige Typen der B-Gruppe sind des öfteren für Myokarditiden und Encephalo-Myokarditis[4], insbesondere im Säuglingsalter, verantwortlich gemacht worden. Von erheblicher Bedeutung ist, daß Magoffin, Lennette u. Schmidt[13] kürzlich wahrscheinlich machen konnten, daß die paralytische Poliomyelitis von 25 Patienten durch die Coxsackieviren A9 und B2—B5 hervorgerufen worden ist. Damit werden Beobachtungen bestätigt, die früher bei einzelnen Erkrankungsfällen gemacht worden waren[8,20].

---

* Herrn Prof. Dr. A. Herrlich zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Kinderlähmung.

*** Mit technischer Assistenz von Marianne Sittl.

\+ Auch Typ A 23, der jedoch mit Echovirus Typ 9 identisch ist[19], erzeugt einen cytopathischen Effekt in Affennierengewebekulturen.

Deshalb erschien es uns von nicht unerheblichem Interesse, einen Einblick zu erhalten, wie häufig Infektionen mit diesen sechs Virustypen im süddeutschen Raum vorkommen. Wie bei allen Vertretern der Enterovirusgruppe, so verlaufen auch bei den Coxsackieviren A9 und B1—B5 die allermeisten Infektionen klinisch stumm[5]. Da weiterhin die erkennbaren Erkrankungen oft nur mit Hilfe von virologischen Untersuchungen sicher als Coxsackievirusinfekte diagnostiziert werden können und nur auf diese Weise der verursachende Erregertyp festgestellt werden kann, sind hier epidemiologische Erhebungen weit schwerer zu treffen als bei der Poliomyelitis, bei der die meist schon klinisch eindeutig paralytischen Fälle viele epidemiologische Schlüsse auf die Verbreitung des Virus zulassen. Eine Aussage über die Häufigkeit der „stillen Feiungen" durch Coxsackieviren in der nicht erkrankten Bevölkerung ist am besten durch serologische Übersichtsuntersuchungen zu erhalten, die mit einer größeren Anzahl von Seren durchgeführt werden, welche von gesunden oder notfalls von nicht infektiös erkrankten Personen stammen[21]. Aus diesem Grunde wurden im Jahre 1958 Vorversuche mit 50 Seren von Münchener Kindern und Erwachsenen angesetzt, bei denen in einer endgültigen Serumverdünnung von 1:10 44% der Proben Antikörper gegen Coxsackievirus A9 und 24% gegen Typ B3 aufwiesen[10]. Zur genaueren Information über das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gegen alle sechs der oben angeführten Virustypen wurde daraufhin eine größere Anzahl von Seren gesammelt.

Etliche Voraussetzungen, die gegeben sein müssen, um eine serologische Querschnittsuntersuchung der geplanten Art durchzuführen, konnten für neutralisierende Antikörper gegen Coxsackieviren als vorhanden angenommen werden. Aus zahlreichen Beobachtungen ist zu schließen, daß diese Antikörper ausschließlich als Folge einer Infektion mit dem jeweiligen Virustyp im zirkulierenden Blut auftreten und über einen langen Zeitraum nachweisbar bleiben[6,15]. Sie sind hochgradig typspezifisch. Neutralisierende Antikörper gegen Coxsackie-B-Viren erfahren höchstens durch eine nachfolgende Infektion mit einem anderen Coxsackievirus der B-Gruppe einen heterotypischen „booster effect"[12]. Dadurch besteht die Möglichkeit, aus dem Vorhandensein von derartigen neutralisierenden Antikörpern im Blut eines Individuums auf frühere, unter Umständen auch lange zurückliegende Infektionen zu schließen. Die Zusammenstellung der Ergebnisse einer Gruppe von Personen, die als repräsentativ für die Bevölkerung eines größeren geographischen Bezirkes angesehen werden können, ergibt einen Überblick über die Häufigkeit des Auftretens der betreffenden Erreger in dieser Gegend. Mit den Vertretern der Poliovirusgruppe wurde eine derartige „serologische Epidemiologie" (Melnick[14]) häufig betrieben. Eingehende Untersuchungen über die Altersverteilung von neutralisierenden Antikörpern

gegen andere Enteroviren wurden seltener durchgeführt. Für Echoviren teilten Gibbels u. Scheid[7] aus dem deutschen Raum Untersuchungsergebnisse von 195 Personen mit. Da keine umfangreichen Untersuchungen über das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gegen Coxsackieviren A9 und B1—B5 in einer größeren, nach Altersklassen ausgewählten Bevölkerungsgruppe in der Bundesrepublik vorlagen, haben wir im Laufe des Jahre 1961 482 uns geeignet erscheinende Serumproben für ein derartiges Vorhaben gesammelt.

Herkunft der getesteten Seren

Bei der Auswahl der Proben wurde in Anlehnung an die Vorschläge in der Veröffentlichung der Weltgesundheitsorganisation über immunologische und hämatologische Übersichtsuntersuchungen[21] versucht, eine für die Auswertung genügend große Zahl von Seren zu erhalten. Auch die einzelnen Altersklassen sollten ausreichend viele Proben umfassen. Die Personen, von denen diese Seren stammten, sollten zumindest nicht infektiös erkrankt sein und in einem geographisch begrenzten Bereich ihren Wohnsitz haben. Ein systematisches Sammeln von Seren scheiterte an der Undurchführbarkeit, von allen nach epidemiologischen Gesichtspunkten ausgewählten Personen der gesunden Bevölkerung Blutproben zu entnehmen. So waren wir teils auf Untersuchungsmaterial angewiesen, das von nicht infektiös Erkrankten bei deren Aufnahme in verschiedenen Münchener Krankenhäusern für andersartige Untersuchungen gewonnen worden war*. Fast alle Seren der Altersgruppen zwischen 15 und 50 Jahren stammen jedoch von gesunden Personen, die sich aus verschiedenen Gründen einer Blutuntersuchung unterzogen hatten (Bestimmung der Blutgruppe, Untersuchung der Wa.R. usw.). Als geographisches Kriterium wurde der derzeitige Wohnort angesehen, wenn auch bei vielen Erwachsenen der Zuzug von weiter entfernten Gegenden oder ein Aufenthalt im Ausland nicht ausgeschlossen werden konnten. Über 90% dieser Personen waren wenigstens seit 1950 in München oder Umgebung ansässig. Bei 164 von insgesamt 175 Kindern der Altersklassen 0—14 Jahre konnte der Geburtsort in Erfahrung gebracht werden. 83,5% von ihnen sind in der Stadt oder dem Landkreis München zur Welt gekommen. Eine weitere Unterteilung der untersuchten Individuen außer ihrer Aufgliederung in Altersklassen, etwa nach sozialökonomischen Gesichtspunkten, erschien wegen der vom statistischen Standpunkt aus kleinen Zahl der Untersuchten nicht ratsam. Jedoch dürften die Unterschiede in

* Für ihr freundliches Entgegenkommen bin ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Hilber, vom Kinderkrankenhaus München-Schwabing, und Herrn Chefarzt Dr. Göbel, vom Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München-Nymphenburg, sowie einer Reihe von Ärzten verschiedener Münchener Institutionen zu Dank verpflichtet.

der Hygiene der Lebensführung — soweit sie nicht auf die verschiedene Lebensweise im jeweiligen Lebensalter zurückzuführen sind — nicht sehr groß gewesen sein. Die Zahl der Individuen in den einzelnen Altersgruppen ist zu Vergleichszwecken graphisch dargestellt (Abb. 1).

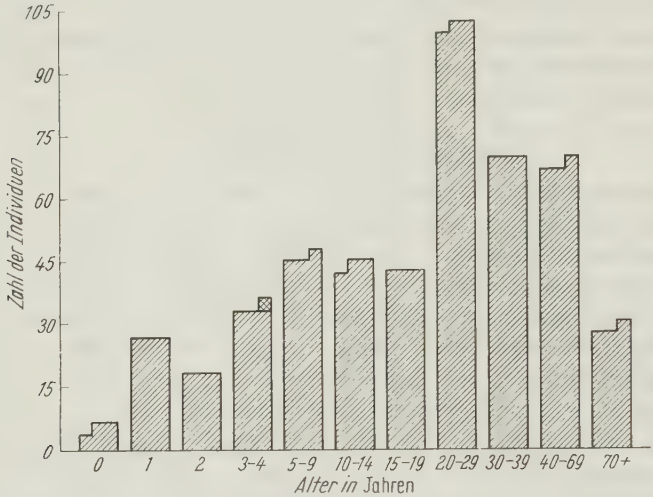


Abb. 1. Zusammensetzung der untersuchten Bevölkerungsgruppe von 482 (bzw. 481) Personen. Graphische Darstellung der Individuenzahl in den verschiedenen Altersklassen. ▨ 1 Individuum; ▩ ein Serum konnte nicht auf sämtliche Antikörper untersucht werden (siehe auch Tab. 1)

Methodik

Sämtliche Seren wurden bis zu ihrer Verarbeitung bei −20° C eingefroren aufbewahrt. Getestet wurden sie nach 30 min Inaktivierung bei 56° C in einer endgültigen Verdünnung von 1:10. Die verschiedenen Virusstämme kamen für die Teste, entsprechend der jeweiligen Zellart, in einer Verdünnung von 100 $TCID_{50}$ zur Verwendung. Das Virus-Serumgemisch wurde zur Bindung für 60 min bei Zimmertemperatur gehalten. Für die Untersuchungen mit den Virustypen Coxsackie A9, B1, B3 und B5 wurden primäre menschliche Amnionzellkulturen, für die Coxsackieviren B2, B4 und die Polioviren Typ 1 und 3 wurden Affennierenzellkulturen (Rhesus) benützt.

Folgende Stämme wurden verwendet:

Coxsackie Typ A9: Stamm P.B.	$10^{5,8}$ (Amnion)*
Coxsackie Typ B1: Stamm P.O.	$10^{5,6}$ (Amnion)
Coxsackie Typ B2: Stamm Ohio (Red)	$10^{6,4}$ (Affennieren)
Coxsackie Typ B3: Stamm Nancy	$10^{5,5}$ (Amnion)
Coxsackie Typ B4: Stamm J.V.B.	$10^{5,6}$ (Affennieren)
Coxsackie Typ B5: Stamm Faulkner	$10^{4,8}$ (Amnion)

* $TCID_{50}$ in 0,1 ml Gewebekulturflüssigkeit.

Ergebnisse

In Tab. 1 sind die Prozentzahlen der Antikörperträger für jede Altersgruppe der 482 untersuchten Individuen nach Virustypen getrennt aufgeführt. Insgesamt wurden am häufigsten Antikörper gegen Coxsackievirus Typ B4 (50,7%) und A9 (49,5%) festgestellt. In Abb. 2 wurde die

Tabelle 1. *Tabelle über das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gegen Coxsackie- und Polioviren in der untersuchten Gruppe von 482 (481) gesunden Personen*

Altersgruppe (in Jahren)	Zahl der Untersuchten	Prozentzahl von Individuen mit neutralisierenden Antikörpern gegen							
		Coxsackievirus Typ						Poliovirus Typ	
		A9	B1	B2	B3	B4	B5	P1	P3
0	5	1/5**	0/5	0/5	0/5	2/5	1/5	2/5	1/5
1	27	37,0	0	0	11,1	0	18,5	18,5	15,0
2	18	11,1	0	0	27,7	16,6	16,6	39,0	44,4
3—4	34 (33*)	26,4	5,8	17,6	30,3*	38,2	24,2*	44,0	33,3*
5—9	47	23,6	19,0	40,0	30,0	32,0	25,5	49,0	38,0
10—14	44	45,4	32,0	43,0	40,9	45,4	18,1	63,6	47,7
15—19	42	69,0	28,6	47,6	40,4	57,1	16,6	59,5	71,4
20—29	101	63,3	33,6	52,5	37,6	59,4	15,8	67,3	52,5
30—39	69	62,3	31,8	44,9	39,1	68,1	29,0	82,0	69,5
40—69	67	56.7	31,3	64,1	44,7	58,2	28,3	83,6	77,6
70 u. älter	28	68,0	53,5	75,0	39,2	75,0	28,7	71,4	82,0
Insgesamt 482 (481)		**49,5**	27,0	44,4	36,3	**50,7**	22,3	63,7	56,3

* Zu wenig Serum für die Durchführung sämtlicher Teste (eine Blutprobe).
** Wegen zu geringer Zahlen nicht berechnet.

prozentuale Häufigkeit des Vorkommens der Antikörper für jeden einzelnen Typ graphisch dargestellt. Die Ordinaten geben hierbei die Prozentzahl positiver Individuen, die Abszissen die Altersklassen an. Die Werte der insgesamt weniger häufig zu beobachtenden Antikörper (gegen die Coxsackievirustypen B5 in 22,3%, B1 in 27,0% und B3 in 36,3%) wurden zu einer „Gruppe 1" zusammengelegt, die Prozentzahlen von Coxsackievirus A9, B2 und B4 zur „Gruppe 2" vereinigt und die Ergebnisse der Teste mit Poliovirus Typ 1 und 3 zur „Gruppe 3" zusammengefaßt. Die so entstandenen Zahlen sind in Abb. 3 als Kurven dargestellt. Die Altersklassen auf der Abszisse dieser Abbildung nehmen einen verschieden großen Raum ein, und zwar wurde den Altersklassen 0—19 Jahre im Verhältnis etwa zweieinhalbmal soviel Platz eingeräumt wie den Altersklassen 20—70 Jahre und älter. Die Stelle, an welcher der Maßstab wechselt, ist durch einen Doppelstrich gekennzeichnet. Die Gesamtzahl der untersuchten Individuen beträgt 482. Einige Male sind jedoch nur 481 Personen angeführt, da von einem Individuum nicht genug Serum für sämtliche Teste zur Verfügung stand. Dies wurde bei der Berechnung

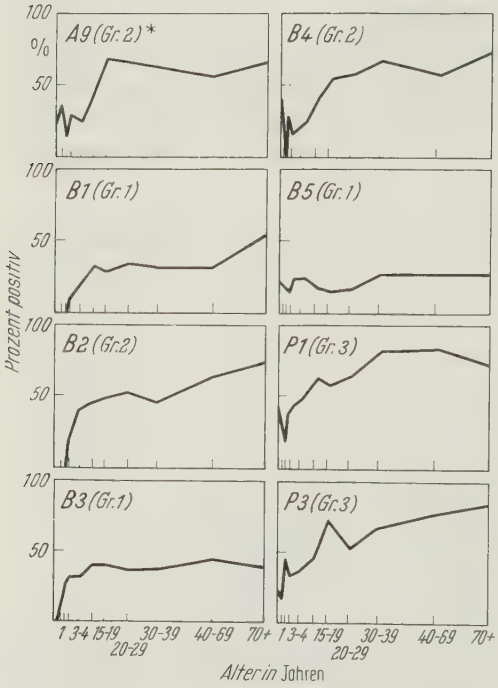


Abb. 2. Das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gegen Coxsackievirus *A* 9 und *B* 1—5 in verschiedenem Lebensalter. (Zum Vergleich: Antikörper gegen Poliovirus Typ 1 und 3 derselben Individuen.) * *Gr.* = Gruppe. Kombinierte Kurven aus Abb. 3 ersichtlich

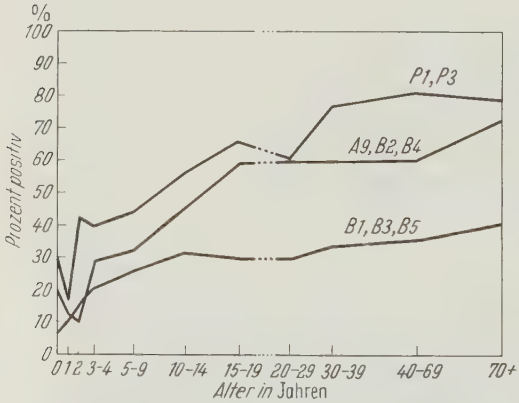


Abb. 3. Kombinierte Kurven über die Häufigkeit von neutralisierenden Antikörpern bei 481 Personen verschiedenen Lebensalters. Die Werte folgender Typen wurden zu Gruppen vereinigt: Coxsackievirus Typ *B* 1, *B* 3, *B* 5 — Coxsackievirus *A* 9, *B* 2, *B* 4 und zum Vergleich Poliovirus Typ 1 und 3. (0—19 Jahre in größerem Maßstab als 20—70 Jahre und älter)

der Prozentzahlen berücksichtigt. In Abb. 3 sind die Teilergebnisse dieser Person nicht in die angegebenen Werte mit einbezogen worden. Die Häufung von neutralisierenden Antikörpern gegen die verschiedenen Virustypen in den Seren derselben Individuen wurde in Tab. 2 angeführt. Die höchsten Werte für die untersuchten Coxsackie- und Polioviren sind bei jeder Altersgruppe hervorgehoben.

Besprechung der Ergebnisse

Bei der außerhalb von umschriebenen, kleinen Epidemien in unseren Breiten anscheinend selten beobachteten Erkrankung durch Coxsackieviren schien die Frage von Interesse, ob Infektionen durch diese Viren möglicherweise ebenso seltene Vorkommnisse darstellen. Die Ergebnisse der beschriebenen Untersuchungen deuten darauf hin, daß zahlreiche stille Feiungen unbemerkt in der Bevölkerung vonstatten gehen müssen. Die Prozentzahlen der Antikörperträger gegen die beiden am häufigsten beobachteten Coxsackieviren (B4 und A9) bleiben nur wenig hinter den Werten für die Polioviren Typ 1 und 3 zurück bzw. über-

flügeln in einzelnen Altersgruppen sogar die Zahlen für den einen oder anderen Poliovirustyp. Die graphisch dargestellte prozentuale Häufigkeit der Antikörper in den verschiedenen Altersklassen für jeden der acht untersuchten Virustypen läßt mit Ausnahme der Kurve für Coxsackievirus B5 eine rasche Zunahme von Antikörperträgern in den ersten Lebensjahren

Tabelle 2. *Aufstellung über das Vorkommen von mehreren neutralisierenden Antikörpern gegen die untersuchten Virustypen in denselben Individuen*

Altersgruppe (in Jahren)	Zahl der Untersuchten	Prozentzahl der Personen mit neutralisierenden Antikörpern gegen									
		Coxsackievirustypen							Poliovirustypen		
		0	1	2	3	4	5	6	0	1	2
0**	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	27	**74,1**	18,5	7,4	—	—	—	—	**74,1**	18,5	7,4
2	18	**50**	32,2	11,1	5,5	—	—	—	38,9	**44,4**	16,7
3—4	33	**30,3**	27,3	24,2	12,1	3	3	—	**51,5**	21,2	27,3
5—9	47	19,1	**34**	25,5	8,5	4,5	8,5	—	35,7	**40,4**	23,4
10—14	44	11,4	13,6	**36,4**	20,5	13,6	4,8	—	22,7	**43,2**	34,1
15—19	42	7,2	7,2	30,9	**33,3**	16,9	4,8	—	14,3	40,5	**45,2**
20—29	101	5,9	14,9	**25,8**	24,8	22	6,9	—	14,9	**50,5**	34,7
30—39	69	5,6	14,5	20,2	**29**	21,8	5,6	2,8	5,6	36,2	**58**
40—69	67	2,9	16,4	20,9	**28,3**	19,1	8,9	2,9	2,9	32,8	**64,2**
70 u. älter	28	—	7,1	21,4	**25**	**25**	14,3	7,1	7,1	32,1	**60,7**
Insgesamt:	481	14,1	17,3	**23,5**	21,4	15,2	6,2	1,2	20,8	37,8	**40,3**

** Wegen zu geringer Zahlen nicht berechnet.

erkennen, die bei einigen Viren in schwächerem Maße auch noch für die späteren Lebensjahre festzustellen ist (B2, B4 und die Polioviren). In der Altersgruppe 70 Jahre und älter zeigen auch die Kurven für Coxsackievirus A9 und B1 einen Anstieg, der etwas überraschend erscheint, da man im hohen Lebensalter eher ein Absinken der Zahl von Individuen mit in einer Serumverdünnung von 1:10 nachweisbaren Antikörpern erwartet hätte. Da es sich bei den Personen in dieser Altersklasse leider fast durchwegs um Patienten mit urologischen oder dermatologischen Erkrankungen handelt, ist die Möglichkeit einer unspezifischen Hemmung des cytopathischen Effektes oder ein nicht spezifischer booster-effect nicht von der Hand zu weisen. Gewisse Ähnlichkeiten im Verlauf der verschiedenen Antikörperkurven haben zu dem Versuch geführt, das Typische ihres Erscheinungsbildes durch Zusammenlegung zu Gruppen besser herauszuarbeiten. Die Gruppe 1 (Cox B1, B3, B5) umfaßt die drei Virustypen mit den insgesamt niedrigsten Prozentzahlen antikörperpositiver Individuen. In den Altersgruppen 5—9 Jahre und 10—14 Jahre erreichen diese Kurven bereits ihren Höhepunkt, den sie später kaum mehr

überschreiten. In der Gruppe 2 der in Abb. 3 dargestellten kombinierten Kurven sind die Werte für die Coxsackieviren A9, B2 und B4 verarbeitet. Die Kurven der beiden letzteren zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die der Polioviren. Die Anzahl antikörperpositiver Personen steigt erst rasch, im späteren Lebensalter langsam an. Nahezu gleich häufig wie Antikörper gegen Coxsackievirus B4 waren solche gegen den Typ A9 zu beobachten. Obwohl sich die diesbezügliche Kurve in Abb. 2 für die Lebensalter über 20 Jahre abflacht, wurden die Werte für Coxsackievirus A9 in die Gruppe 2 mit einbezogen. Diese kombinierte Kurve zeigt ebenfalls einen ziemlich gleichsinnigen, nur etwas niedrigeren Verlauf wie die kombinierte Kurve für die Polioviren. Die Deutung derartiger Ergebnisse ist in großen Zügen nicht schwierig und kann den bekannten Beobachtungen bei Poliomyelitisviren folgen. Starke Unregelmäßigkeiten in einzelnen Kurvenverläufen, die durch ungewöhnlich hohe oder niedere Werte in einzelnen Altersgruppen entstanden sind, können durch die Streuung innerhalb der statistischen Fehlergrenze hervorgerufen sein. Wesentlich größere Fehlerquellen entstehen jedoch oft durch die Auswahl der zu untersuchenden Individuen. Es ist unvermeidlich, daß unter den in Mitteleuropa bestehenden Verhältnissen ein Sammeln von Seren nach rein epidemiologischen Gesichtspunkten nicht durchführbar ist. Das Zurückgreifen auf Seren, die aus anderen Gründen entnommen wurden, wird nie ohne Gefahren für die Richtigkeit von „Zufalls"-Ergebnissen sein, die einen repräsentativen Querschnitt durch die immunologischen Verhältnisse in der Gesamtbevölkerung darstellen sollen. Die Zuwanderung großer Zahlen von Flüchtlingen und Vertriebenen und der teilweise jahrelange Aufenthalt der ansässigen Bevölkerung im Ausland während Krieg und Frieden verwischen die Aufschlüsse erheblich, die man zu erhalten hofft. Bei der Durchführung der Untersuchungen geht man ja von der Annahme aus, daß die festgestellten Antikörper am augenblicklichen Wohnort des Untersuchten erworben worden sind. Aber selbst, wenn dies der Fall war, scheinen sich doch erhebliche Fehlerquellen dadurch zu ergeben, daß die Durchseuchung der Bevölkerung nicht in einer breiten Welle, sondern zusammengesetzt aus vielen Einzelherden vor sich geht[5]. Es wurde versucht, diese Faktoren bei der Sammlung der zu untersuchenden Blutproben zu berücksichtigen und die Zahl der Individuen je Altersklasse (siehe Tab. 1) auf annähernd wenigstens 30 Personen zu bringen. Wesentlich stärker vertreten sind lediglich die Altersgruppen 20—29, 30—39 und 40—69 (Abb. 1).

Die serologischen Voraussetzungen für die Durchführung der Untersuchungen wurden bereits in der Einleitung erwähnt. Als weiterer Beweis dafür, daß die neutralisierenden Antikörper gegen die Coxsackievirustypen A9 und B1—5 häufig lebenslang nachweisbar sind, können die Ergebnisse in Tab. 2 angesehen werden. Mit zunehmendem Alter besitzen

immer mehr Individuen verschiedene neutralisierende Antikörper. Während 74,1% der einjährigen Kinder noch keine Coxsackieantikörper zeigen, sind in sämtlichen Seren der Siebzigjährigen und Älteren Antikörper nachzuweisen, und die Hälfte von ihnen weist drei und vier verschiedene Antikörper auf.

Bei der Bewertung der Ergebnisse darf nicht außer acht gelassen werden, daß lediglich die augenblicklichen immunologischen Verhältnisse der Untersuchten festgestellt worden sind. Abgesehen davon, daß Epidemien diese Resultate rasch und vollständig verändern können, ist es sehr fraglich, ob z. B. der niedere Kurvenverlauf der Antikörper gegen Coxsackievirus B5 in einigen Jahren noch gleichartig sein wird. Die Voraussetzung dafür wäre, daß das Risiko für eine Infektion mit Cosackievirus B5 im Laufe der Zeit stets dasselbe verhältnismäßig geringe sein würde, will man den flachen Kurvenverlauf auf das seltenere Vorkommen dieses Virustyps zurückführen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei den Untersuchungen auf Echovirusantikörper in der Bevölkerung von Louisiana bei zwei Echovirustypen festgestellt werden[9]. Die Entstehung derartiger flacher Kurven, die oft keinen weiteren Anstieg der Prozentzahlen von Antikörperpositiven im Erwachsenenalter mehr zeigen, sind nicht ohne weiteres erklärbar. Eine eingehende Auswertung dieser Ergebnisse ist hierfür notwendig, die nicht nur die epidemiologischen und statistischen, sondern auch die serologischen Gegebenheiten berücksichtigt[11,16,22]. Da die vorliegenden Untersuchungen lediglich in einer endgültigen Serumverdünnung von 1:10 vorgenommen wurden, sind auch Antikörpertiter von weniger als 1:10 als negativ und sämtliche Titer über 1:10 als positiv gewertet worden. Für die weitere Analysierung der Antikörperverteilungskurven wird es notwendig sein, auch die Titerhöhen der positiven Seren zu bestimmen. An Hand der vorliegenden Ergebnisse lassen sich immerhin das Vorkommen und die Häufigkeit des Auftretens der sechs verschiedenen getesteten Coxsackievirustypen in der Bevölkerung abschätzen.

Zusammenfassung

Die Seren von 482 Personen verschiedenen Alters wurden auf das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gegen die Coxsackievirustypen A9 und B1 bis B5, ferner zum Vergleich gegen die Polioviren Typ 1 und 3 getestet. Gegen sämtliche Viren waren Antikörper in einer beträchtlichen Anzahl der Individuen nachweisbar. Durch Zusammenlegung der Werte der häufig vorkommenden Antikörper (gegen A9, B2, B4), der weniger häufig aufgetretenen Antikörper (gegen B1, B3, B5) und der Poliovirus-Antikörper wurden drei Gruppen aufgestellt, welche die Darstellung kombinierter Kurven für die Alters-

verteilung der Antikörper erlaubten. Dadurch konnte ein klarerer Kurvenverlauf erzielt werden. Weiter wurde die Häufigkeit des Vorkommens von Antikörpern gegen diese acht Viren in denselben Individuen untersucht. Sie steigt mit dem Lebensalter an. An Hand aller Ergebnisse wurde versucht, Rückschlüsse auf die Häufigkeit der stillen Feiungen in der betreffenden Bevölkerung zu ziehen.

Literatur

[1] Dalldorf, G.: The Coxsackie group of viruses. Science **110**, 594 (1949).

[2] Dalldorf, G.: The Coxsackie viruses. Bull. N. Y. Acad. Med. **26**, 329—335 (1950).

[3] Dalldorf, G., and G. M. Sickles: An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. Science **108**, 61—62 (1948).

[4] Expert Committee on Poliomyelitis. Second report. Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser. **145**, 27—30 (1958).

[5] Gelfand, H. M.: The occurrence in nature of the Coxsackie and Echo-viruses. Progr. med. Virol. **3**, 193—244 (1961).

[6] Gelfand, H. M., W. W. Henigst, J. P. Fox and D. R. Le Blanc: Longitudinal studies of enteric viral infections. 6. Int. Kongr. für Tropenmedizin. Lissabon 1958.

[7] Gibbels, E., u. W. Scheid: Über das Verhalten neutralisierender Antikörper gegenüber 14 Echo-Virustypen bei Kindern und Erwachsenen aus Westdeutschland. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **182**, 425—442 (1961).

[8] Hammon, W. Mc. D., D. S. Yohn, E. H. Ludwig, R. A. Pavia, G. E. Sather and L. W. McCloskey: A study of certain nonpoliomyelitis and poliomyelitis enterovirus infections: clinical and serologic associations. J. Amer. med. Ass. **167**, 727—735 (1958).

[9] Henigst, W.: Beitrag zur Epidemiologie der Echoviren. Dtsch. med. Wschr. **84**, 1022—1028 (1959).

[10] Henigst, W.: Infektion und stille Feiung durch Polio- und Coxsackieviren. Beobachtungen bei Kleinkindern. (Im Druck.)

[11] Le Bouvier, G. L.: On the rise and decline of poliovirus antibodies in different human populations. Amer. J. Hyg. **66**, 342—362 (1957).

[12] Lennette, E. H., T. T. Shinomoto, N. J. Schmidt and R. L. Magoffin: Observations on the neutralizing antibody response to group B Coxsackie viruses in patients with central nervous system disease. J. Immunol. **86**, 257—266 (1960).

[13] Magoffin, R. L., E. H. Lennette and N. J. Schmidt: Association of Coxsackie viruses with illnesses resembling mild paralytic poliomyelitis. Pediatrics **28**, 602—613 (1961).

[14] Melnick, J. L., J. R. Paul and M. Walton: Serologic epidemiology of Poliomyelitis. Amer. J. publ. Hlth **45**, 429—437 (1955).

[15] Pohjanpelto, P.: The Coxsackie group of viruses. Epidemiological studies. Ann. Med. exp. Fenn. **33**, Suppl. Nr. 6, 1—75 (1955).

[16] Sauthoff, R., E. Hansert u. H. K. Mittelstrass: Studie zur Altersabhängigkeit der Seroimmunität gegen die Poliomyelitisviren und das Echovirus Typ 9. Klin. Wschr. **36**, 362—367 (1958).

[17] Sickles, G. M., P. Feorino and H. Plager: Isolation and type determination of Coxsackie Virus, Group B, in tissue culture. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **88**, 22—24 (1955).

[18] Sickles, G. M., M. Mutterer, P. Feorino and H. Plager: Recently classified types of Coxsackie Virus, Group A. Behavior in tissue culture. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **90**, 529—531 (1955).

[19] Sickles, G. M., M. Mutterer and H. Plager: New types of Coxsackie virus, group A. Cytopathogenicity in tissue culture. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **102**, 742—743 (1959).

[20] Steigmann, A. J.: Poliomyelitis properties of certain non-polio viruses: enterovirus and the Heine-Medin disease. J. M. Sinai Hosp. **25**, 391—400 (1958).

[21] Study group on imm. and haem. surveys. Immunological and haematological surveys. Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser. **181**, 21—22 (1959).

[22] Turner, T. B., D. H. Hollander, S. Buckley, U. P. Kokko and C. P. Winsor: Age incidence and seasonal development of neutralizing antibodies to Lansing poliomyelitis virus. Amer. J. Hyg. **52**, 323—347 (1950).

Oberarzt Dr. W. Henigst,
Staatl. Bakteriologische Untersuchungsanstalt, 8 München 3 BS, Lazarettstr. 60

Zeitschrift f. Hygiene 148, 318—344 (1962)

Aus dem Hygienischen Institut der Universität Innsbruck
(Vorstand: Prof. Dr. Alfred Schinzel)

Zur Biosynthese der Dipicolinsäure

Ein Beitrag zur Biologie der Sporenbildung

Von
H. Benger

Mit 18 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Dezember 1961)

Die Fähigkeit mancher Bacillen- und Clostridiensporen, auch unter extremen physikalischen Bedingungen und chemischen Einwirkungen ihre Lebensfähigkeit zu bewahren, ist seit Jahrzehnten bekannt. Die in den meisten Fällen um ein Vielfaches größere Resistenz der Sporen im Vergleich mit den zugehörigen vegetativen Formen wurde wiederholt untersucht, ohne daß es gelungen wäre, eine befriedigende Erklärung zu finden. In ihrer chemischen Zusammensetzung in bezug auf ihre Aminosäurekomponenten unterscheidet sich die Spore nicht wesentlich von der zugehörigen vegetativen Form (Davies jr. u. Williams), lediglich auf immunbiologischem Wege konnten Unterschiede in den Proteinen in bezug auf ihre Antigen-Eigenschaft festgestellt werden (Tomcsik u. Baumann-Grace; Mellon u. Anderson; Doak u. Lamanna; Schlossberger). Auch die Untersuchungen von Lawrence u. Halvorson, die ergaben, daß vegetative Zellen von B. terminalis mehr D-Aminosäuren enthalten als die entsprechenden Sporen, können nicht zur Klärung beitragen.

Im Jahre 1953 entdeckte Powell, daß Bacillensporen bei der Keimung an die Kulturflüssigkeit Dipicolinsäure (DPS) (Pyridin-2,6-dicarbonsäure) abgeben. Außer bei der Keimung wird Dipicolinsäure von den Sporen auch beim Erhitzen an das wäßrige Medium abgegeben. Während Dipicolinsäure aus allen bisher untersuchten, auf übliche Weise gezüchteten Bacillen- und Clostridiensporen nachgewiesen werden konnte, ist sie in den entsprechenden vegetativen Zellen nicht vorhanden (Foster). Dipicolinsäure wurde erstmalig von Udo in „Natto" aufgefunden.

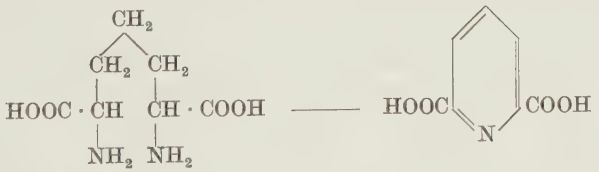
Da es sich bei Natto um ein Fermentationsprodukt aus Sojabohnen unter Einwirkung des Bac. natto handelt (Kindaichi) und B. natto wahrscheinlich mit B. subtilis identisch ist (Bergey), dürfte die Dipicolinsäure bei der Keimung der Bacillensporen an das Nahrungsmittel abgegeben worden sein.

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß Aubert, Millet, Pineau u. Milhaud in den Vorsporen von B. megaterium, jedoch weder in den vegetativen Zellen noch in den reifen Sporen, beachtliche Mengen von N-Succinyl-l-Glutaminsäure fanden.

Die bisher über die Korrelation zwischen Dipicolinsäuregehalt und Hitzeresistenz erhobenen Befunde widersprechen einander. So fanden Martin u. Foster [1958 (2)] bei B. megaterium-Sporen sowie Church u. Halvorson bei B. cereus eine Abnahme der Hitzeresistenz mit abnehmendem Dipocolinsäuregehalt. Demgegenüber konnten Byrne, Burton u. Koch an Sporen von Clostridium roseum ein gegenteiliges Verhalten feststellen.

Halvorson u. Howitt konnten in einer Untersuchung zeigen, daß DPN · H-Oxydase aus B. cereus T bei Gegenwart von Dipicolinsäure signifikant langsamer durch Hitze inaktiviert wird. In diesem Zusammenhang erscheint ferner die Beobachtung von Braams bedeutsam, daß Dipicolinsäure die Strahlenresistenz von Hefeinvertase gegen Deuteronen, α-Teilchen und Protonen steigert. Wenn auch die Frage des Zusammenhanges zwischen Hitzeresistenz und Dipicolinsäuregehalt der Sporen nicht abschließend geklärt ist und noch weiterer Untersuchungen bedarf, so ist ohne Zweifel die Dipicolinsäure als solche eine charakteristische, in allen Bakteriensporen vorkommende Substanz und ihre Biosynthese von größtem Interesse, dies schon aus dem Grunde, da eine kritische Prüfung der bisher in der Literatur angegebenen Synthesenwege noch nicht erfolgt ist.

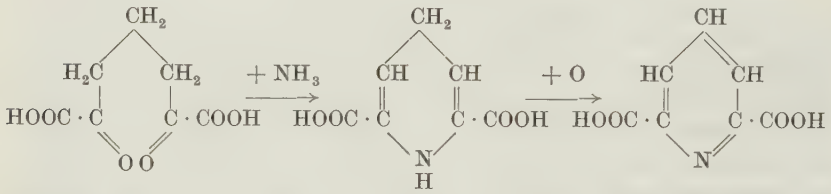
Perry u. Foster (1955) versuchten, die Entstehung der Dipicolinsäure aus der α,ε-Diaminopimelinsäure durch direkten Ringschluß über eine Abspaltung von NH_3 zu beweisen:



Bei Zugabe von C^{14}-markierter Diaminopimelinsäure zu endotroph sporulierenden Zellen von B. cereus, var. mycoides, wurde nur ein kleiner Teil der Radioaktivität in der Dipicolinsäure gefunden. Demgegenüber konnten aber Powell u. Strange (1956) keinerlei Beeinflussung der Sporenbildung von B. cereus durch Diaminopimelinsäure feststellen, ebenso waren Versuche, mit B. cereus-Homogenaten eine Oxydation oder Desaminierung der Diaminopimelinsäure nachzuweisen, erfolglos. Ebenso konnten Martin u. Foster [1958 (2)] an C^{14}-markierten B. megaterium-Zellen in Kompetitiv-Versuchen keine Aufnahme

von Diaminopimelinsäure und keinen Umbau in Dipicolinsäure nachweisen.

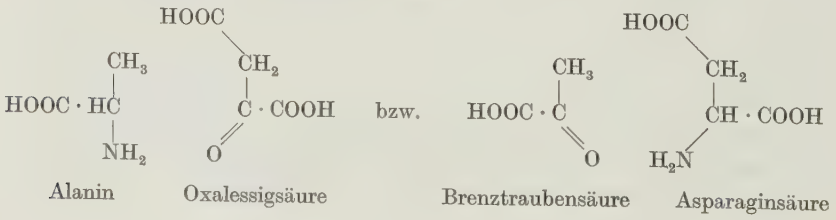
An Hand weitergehender Versuche in dieser Richtung konnten Powell u. Strange (1959) zeigen, daß α,ε-Diketopimelinsäure bei Inkubation mit Ammoniumchlorid in Gegenwart von Bakterienhomogenaten unter Sauerstoffaufnahme eine Verbindung liefert, deren UV-Absorptionsspektrum mit dem von Dipicolinsäure identisch war. Homogenate aus E. coli waren gleich wirksam wie solche von B. cereus. Die beiden Autoren konnten auch durch Inkubation von α,ε-Diketopimelinsäure mit Ammoniumacetat in Abwesenheit von Bakterienhomogenaten Dipicolinsäure erhalten.



Ringschlüsse von α,ε-Diketonen in Anwesenheit von Ammoniak zu Pyridinderivaten sind als Knoevenagelsche Synthese in der präparativen organischen Chemie seit langer Zeit bekannt (Elderfield), ohne daß es bisher gelungen wäre, zu beweisen, daß auch die Biosynthese des Pyridinringes auf einem solchen Wege verläuft. Diesbezügliche Versuche von Powell u. Strange (1959), α,ε-Diketopimelinsäure in Bacillenhomogenaten nachzuweisen, waren ohne Erfolg.

Grimshaw u. Marion konnten beweisen, daß in höheren Pflanzen der Pyridinring aus kleinen Einheiten, wie Glycin oder Alanin, vielleicht auch aus stickstofffreien Verbindungen und Ammoniak, aufgebaut wird. Damit in Einklang stehen auch die Versuche von Martin u. Foster [1958 (2)], deren Befunde an Hand von Versuchen mit radioaktiv markierten Aminosäuren auf einen anderen Weg der Biosynthese führten.

Dipicolinsäure soll demnach durch Kondensation und Ringschluß aus einer C_3- und einer C_4-Verbindung entstehen. In diesem Zusammenhang wurden die Kombinationen Alanin-Oxalessigsäure bzw. Brenztraubensäure-Asparaginsäure vorgeschlagen.



Wenn auch die ausgezeichneten Untersuchungen von Martin u. Foster [1958 (2)] die Möglichkeit der Bildung von Dipicolinsäure durch Kondensation aus C_3- und C_4-Stücken erweisen, so wäre doch auch eine Bildung aus C_2- und C_5-Stücken zu erwägen. Darauf wird in der zitierten Arbeit nicht eingegangen, obgleich dieser Syntheseweg im Hinblick auf die zentrale Stellung der Glutaminsäure im Bakterienstoffwechsel als besonders naheliegend einer eingehenderen Prüfung wert wäre. Die folgenden Versuche wurden mit der Absicht unternommen, die Wahrscheinlichkeit für diesen Syntheseweg gegenüber anderen zu prüfen.

Methoden

Um möglichst übersichtliche Verhältnisse in den Kulturbedingungen zu gewährleisten, wurden alle Untersuchungen mit B. megaterium durchgeführt, da dieser auch auf einfach zusammengesetzten, vollsynthetischen Nährböden gut wächst und versport.

Der für die Untersuchungen verwendete Stamm von B. megaterium N.C.T.C. 7581 (Gibson) wurde freundlicherweise von der British National Type Culture Collection zur Verfügung gestellt. Daneben wurde noch ein am Hygienischen Institut der Universität Innsbruck aus einer Bodenprobe isolierter Stamm von B. megaterium verwendet (Meg 106).

Um einheitliches Ausgangsmaterial für alle Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurden 8 Tage bei 37° C auf 1%igem Glucose-Fleischwasseragar bebrütete Kulturen, die nach dieser Zeit praktisch völlig versport waren, mit M/100 Phosphatpuffer von p_H 7,2 abgeschwemmt und auf der Zentrifuge so lange mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis die überstehende Flüssigkeit keine Absorption bei 270 mμ in einer Schichtdicke von 1 cm zeigte. Die gewaschenen Sporen wurden in Phosphatpuffer resuspendiert und auf eine Trübung von 1,00 bei 600 mμ und 1 cm Schichtdicke eingestellt. Diese Sporensuspension wurde im Kühlschrank aufbewahrt; vor dem Überimpfen wurde die benötigte Menge jeweils durch 10 min langes Erhitzen auf 85° C aktiviert.

Der für die weiteren Untersuchungen verwendete Nährboden hatte folgende Zusammensetzung (Nakata u. Halvorson):

K_2HPO_4	5,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	2,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,08 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,05 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0005 g
Wasser	ad 1000,0 ml

Als Kohlenstoffquelle wurde 1,0 g Glucose pro Liter Nährboden zugesetzt; im Bedarfsfalle wurden andere Kohlenstoffquellen verwendet.

Zucker und Kaliumphosphat wurden jeweils getrennt in 100 ml Wasser, die übrigen Salze, entsprechend den oben beschriebenen Endkonzentrationen, in 800 ml gelöst; die drei Lösungen wurden getrennt im Autoklaven bei 1 atü 30 min sterilisiert und nach dem Erkalten gemischt. Der p_H-Wert wurde auf 7,30 eingestellt. Zur Herstellung fester Nährböden wurden der Salzlösung vor der Sterilisation 25 g Difco-Agar, der dreimal je 12 Std mit destilliertem Wasser gewaschen worden war, zugesetzt.

Bestimmung der Dipicolinsäure

Dipicolinsäure zeigt in wäßriger Lösung ein charakteristisches UV-Absorptionsspektrum mit einem deutlich ausgeprägten Maximum bei 273 mμ (Abb. 1, siehe unten). Andererseits ist aber die Dipicolinsäure durch ihre Fähigkeit ausgezeichnet, mit mehrwertigen Metallen Chelate zu bilden (Suzuki u. Yamasaki), wobei sich auch die Absorptionsspektren in charakteristischer Weise ändern (Slepecky). Bei den in üblicher Weise gezüchteten Sporen findet sich vor allem das Calciumsalz der Dipicolinsäure, wie schon Powell bei ihren ersten Untersuchungen feststellen konnte. Tinelli sowie Woese u. Morowitz bestimmten Dipicolinsäure als Calciumsalz durch direkte Ausmessung des UV-Hauptabsorptionsmaximums des Calcium-Dipicolinates bei 270 mμ, während Perry u. Foster und Krishna Murty u. Halvorson aus den Sporenextrakten die Dipicolinsäure durch Ätherextraktion isolierten und anschließend einer papierchromatographischen Reinigung unterzogen. Die Dipicolinsäure-Flecke wurden mit heißem Wasser extrahiert und die wäßrigen Auszüge photometriert. Eingehende Untersuchungen von Martin u. Foster [1958 (1)] zeigten aber, daß die normalerweise verwendeten Chromatographiepapiere reichliche Mengen von chelatbildenden Metallen enthalten, die zu abweichendem Verhalten bei der Chromatographie führen. Aus diesem Grunde wurde von den beiden Autoren zur quantitativen Bestimmung der Dipicolinsäure die direkte Photometrie des Rückstandes nach Ätherextraktion und Wiederaufnahme in Wasser empfohlen. Die Schwierigkeiten in der quantitativen Bestimmung, die sich aus der Änderung des UV-Spektrums bei Chelatbildung mit verschiedenen Metallen ergeben, vermeidet die Methode von Janssen, Lund u. Anderson, die auf der Messung des rotgefärbten Komplexes von Dipicolinsäure mit Fe-(II)-Salzen beruht. Allerdings ist diese Methode um mehr als zehnmal unempfindlicher als die Messung der UV-Absorption.

Reine Dipicolinsäure zeigt in wäßriger Lösung ein einziges Absorptionsmaximum bei 273 mμ (Abb. 1). Nach Zusatz von Perchlorsäure verschiebt sich das Maximum nach 271,5 mμ, wobei gleichzeitig die Extinktion etwas abnimmt. Die Metallchelate der Dipicolinsäure geben in neutraler Lösung alle deutlich voneinander verschiedene Absorptionsspektren (Abb. 2 und 3). Diese Chelate sind jedoch in stark saurer Lösung unbeständig, und die Absorptionsspektren werden bei Zusatz von Perchlorsäure zur Chelatlösung mit dem Spektrum der Dipicolinsäure identisch (Abb. 2—4). Reine Perchlorsäure zeigt in dem betrachteten Wellenlängenbereich keinerlei UV-Absorption.

Die Konzentration der Dipicolinsäure in einer zu untersuchenden Lösung kann daher in einfacher Weise durch Messung der UV-Absorp-

tion bei 271,5 mμ bestimmt werden, wenn die Messung nach vorheriger Zugabe von Perchlorsäure erfolgt.

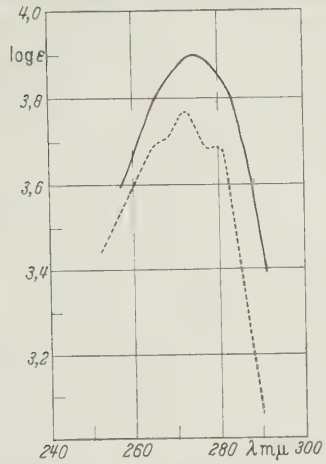


Abb. 1. Absorptionsspektren von Dipicolinsäure; ——— in Wasser; ------ in 0,355 N $HClO_4$

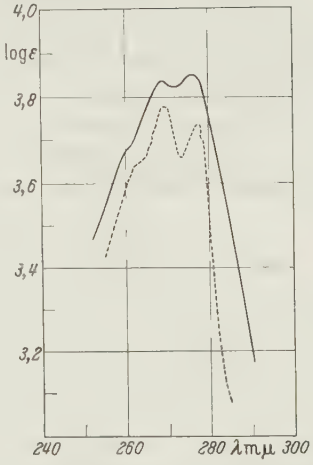


Abb. 2. Absorptionsspektren von Dipicolinsäure in wäßriger Lösung; ——— in Gegenwart von Mg; ------ in Gegenwart von Mn

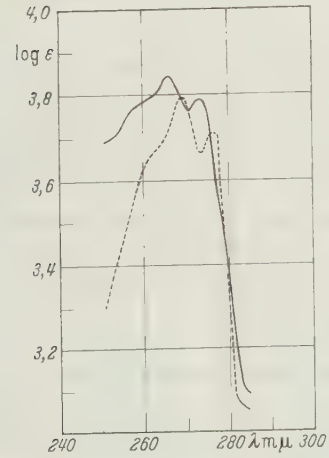


Abb. 3. Absorptionsspektrum von Dipicolinsäure in wäßriger Lösung; ——— in Gegenwart von Fe(II); ------ in Gegenwart von Zn

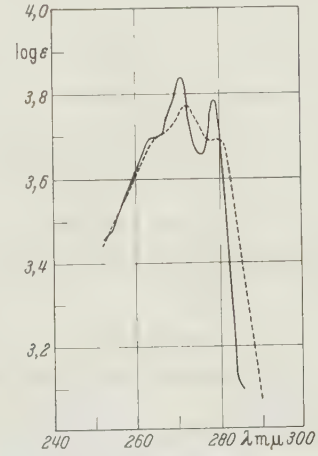


Abb. 4. Absorptionsspektrum von Ca-Dipicolinat; ——— in wäßriger Lösung; ------ in 0,355 N $HClO_4$

Die Spektren von Mg, Mn, Fe, Zn-Dipicolinat sind in 0,355 N $HClO_4$ mit denen von Dipicolinsäure und Ca-Dipicolinat völlig identisch

In üblicher Weise bei 271,5 mμ aufgenommene Eichkurven sind vollkommen geradlinig, das Lambert-Beersche Gesetz ist exakt erfüllt (Abb. 5).

Dipicolinsäure wurde nach der Vorschrift von Hess durch Oxydation von 2,6-Lutidin mit Permanganat hergestellt. Nach fünfmaligem Umkristallisieren aus salzsäurehaltigem Wasser war die Substanz völlig rein. Schmelzpunkt sowie UV-Spektrum waren mit einem kommerziellen Präparat (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz) völlig identisch.

Die UV-Spektren wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II und

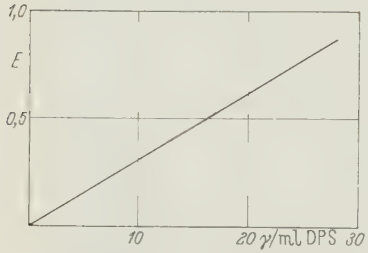


Abb. 5. Eichkurve für Dipicolinsäure in 0.355 N $HClO_4$ = 271,5 mμ; s = 1 cm

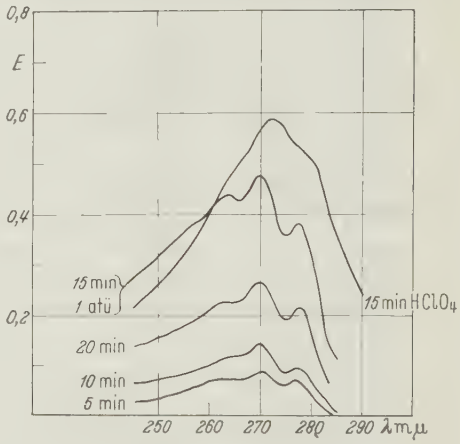


Abb. 6. Absorptionsspektren nach verschieden langem Erhitzen von Sporensuspensionen. Erklärung siehe Text

teilweise mit einem registrierenden Zeiss-Spektralphotometer RPQ 20A aufgenommen.

Ein weiteres Problem ergibt sich noch durch die Notwendigkeit, die Dipicolinsäure zur Bestimmung aus den Bakteriensporen zu extrahieren. Während nach Perry u. Foster (1955) 15 min langes Kochen mit 3 N H_2SO_4 zur völligen Extraktion der Dipicolinsäure aus B. cereus-Sporen notwendig ist, fanden Rode u. Foster, daß die von ihnen untersuchten B. megaterium-Sporen bei 15 min Erhitzen in wäßriger Suspension auf 100° C die gesamte Dipicolinsäure abgeben.

Um diese Frage für die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Stämme von B. megaterium zu klären, wurden gewaschene Sporensuspensionen im kochenden Wasserbad verschieden lange erhitzt; nach dem Abkühlen in Eis wurde zentrifugiert und von den überstehenden Flüssigkeiten die UV-Absorptionsspektren aufgenommen. Außerdem wurden entsprechende Proben in Gegenwart von Perchlorsäure gleich behandelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt.

Bei den untersuchten Stämmen ist Erhitzen im kochenden Wasserbad demnach nicht ausreichend, wohingegen bei Anwesenheit von Perchlorsäure die gesamte Dipicolinsäure nach 15 min abgegeben wird.

Für die nachstehenden Untersuchungen hat sich die Bestimmung der Dipicolinsäure nach folgender Vorschrift bewährt: 5 ml Suspension

der gewaschenen Sporen wurden mit 0,2 ml Perchlorsäure (d = 1,54) versetzt und 20 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde 10 min bei 5000 UpM zentrifugiert und die Extinktion der klaren, überstehenden Flüssigkeit bei 271,5 mμ gemessen. Die Dipicolinsäurekonzentration kann dann direkt der Eichkurve entnommen werden.

Gleichzeitig wurde in einer gesonderten Probe der Sporensuspension der Gehalt an gesamter organischer Substanz nach JOHNSON bestimmt. Die ermittelten Dipicolinsäurewerte wurden auf die gesamte organische Substanz bezogen.

Prüfung der Biosynthese mit intakten Bakterien

Zur Prüfung der Biosynthese wurden vegetative Zellen von B. megaterium auf Agarnährböden der oben beschriebenen Zusammensetzung mit einem Zusatz der zu prüfenden Substanzen (siehe unten) überimpft und bei 37° C 10 Tage bebrütet. Während der Versuchsdauer wurden täglich Ausstriche angefertigt, die Sporen nach Rakette (WINKLE) mit Malachitgrün und Fuchsin gefärbt und der relative Anteil an Sporen mikroskopisch ausgezählt. In identischer Versuchsanordnung wurde die Wirkung der Fermentinhibitoren Bromsulfalein (COHEN u. SALLACH) und Oxaminsäureäthylester (COLOWICK u. KAPLAN) sowie des möglichen Zwischenproduktes der Biosynthese Carboxymethylglutaminsäure (hergestellt nach KORMAN u. CLARKE aus Glutaminsäure und Monobromessigsäure bei Gegenwart von MgO) geprüft.

Prüfung der Fermentaktivität in Bakterienhomogenaten

Die vegetativen Formen bzw. die Vorsporen wurden zu diesem Zweck vom Nährboden abgeschwemmt, gewaschen und mit Glaspulver unter Zusatz von festem CO_2 in der Reibschale verrieben. Das Homogenat wurde in 0,01 M Phosphatpuffer p_H 7,4 bzw. in 0,1 M Tris-Puffer p_H 7,4 aufgenommen und 10 min bei 16000 U/min zentrifugiert. In der überstehenden Flüssigkeit wurde der Proteingehalt nach WARBURG u. CHRISTIAN bestimmt und der Extrakt für den Nachweis verschiedener Fermente verwendet. Im einzelnen wurde die Isocitratase nach DIXON u. KORNBERG, Glykolsäureoxydase nach CLAGETT, TOLBERT u. BURRIS, Glyoxylsäure-Transaminase nach CAMPBELL jr., KARMEN, Glycinoxydase und Succinatoxydase nach STORCK u. WACHSMANN bestimmt.

Direkte Transaminierung zwischen Glyoxylsäure und Glutaminsäure

Die direkte Transaminierung zwischen Glyoxylsäure und Glutaminsäure wurde mit und ohne Bakterienhomogenat papierchromatographisch nachgewiesen (METZLER, OLIVARD u. SNELL). Die papierchromatographische Trennung erfolgte durch aufsteigende Papierchromatographie mit Phenol/Wasser 8:2 oder zweidimensional (in Anwesenheit der Homogenate) mit Butanol/Essigsäure/Wasser 4:1:1 bzw. Phenol/Wasser 8:2. Die Sichtbarmachung der Flecke erfolgte mit Ninhydrin.

Glykolsäureoxydation durch intakte Bakterienzellen

Die Oxydation wurde im Warburg-Apparat bestimmt. Eine Suspension einer 12 Std alten gewaschenen Kultur in 0,15 m Phosphatpuffer p_H 7,6 wurde in Anwesenheit von 10 μMol Mangan und 10 μMol Na-Glykolat für die Messung des Sauerstoffverbrauches verwendet. Temperatur 37° C, Zeit 120 min, Gesamtvolumen 3,5 ml.

Infrarotspektren

Zur Untersuchung wurden einerseits 12 Std alte, viermal mit Wasser gewaschene, vegetative Zellen von B. megaterium, die 12 Std im Vakuum bei 0° C über P_2O_5 getrocknet worden waren, andererseits in gleicher Weise behandelte Sporen verwendet. Der Dipicolinsäuregehalt der Sporen betrug 82 γ/mg organische Substanz. Etwa 2,5 mg Bakterien bzw. Sporen wurden mit 500 mg KBr verrieben und in üblicher Weise zu Plättchen gepreßt. In gleicher Weise wurden auch Dipicolinsäure und Ca-Dipicolinat zur Aufnahme vorbereitet. Die Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer Infracord aufgenommen.

Röntgenspektren

Für die Aufnahme der Röntgenspektren wurden die Bakterien bzw. Sporen von B. megaterium in gleicher Weise wie für die Infrarotspektren vorbereitet. Außerdem wurden Sporen 20 min auf 180° C erhitzt. Durch diese Behandlung wurden einerseits die Sporen abgetötet, andererseits kann aus diesen erhitzten Sporen die Dipicolinsäure schon mit Wasser eluiert werden. Als Vergleichssubstanzen dienten ebenfalls reine Dipicolinsäure und Ca-Dipicolinat. Die Aufnahmen wurden nach der Pulvermethode von Debey-Scherrer mit einem Siemens-Kristalloflex Röntgenspektrometer durchgeführt.

Ergebnisse

Zunächst wurde die Frage untersucht, ob es durch Zusatz verschiedener, unter Umständen als Bausteine für die Dipicolinsäure in Betracht kommender Substanzen zum Grundnährboden zu einer Beeinflussung der Sporenbildung kommt. Da, wie schon eingangs erwähnt, Dipicolinsäure nur in der fertigen Spore und nicht in der vegetativen Zelle oder der Vorspore enthalten ist, kann unter normalen Kulturbedingungen die Sporenzahl als Maß für den Dipicolinsäuregehalt unter der Voraussetzung angesehen werden, daß man von den quantitativen Unterschieden im Dipicolinsäuregehalt der unter differenten Bedingungen gewonnenen Sporen absieht. Da eine Trennung von Sporen und vegetativen Zellen bei nur geringer Versporungsrate aus experimentellen Gründen nicht möglich war, wurde die Bestimmung der Dipicolinsäure nur in den gut versporten Kulturen vorgenommen und auf die auf chemischem Wege nach Johnson bestimmte gesamte organische Substanz bezogen. Die Bestimmung der gesamten organischen Substanz ist genauer und verläßlicher durchführbar als die Bestimmung des Trockengewichtes, das von den meisten Forschern als Bezugswert verwendet wird (Powell 1953; Perry u. Foster 1956; Krishna Murty u. Halvorson).

In Abb. 7 ist der Einfluß der C_2-Verbindungen Essigsäure, Glykolsäure, Glyoxylsäure, Oxalsäure und Glycin, der C_3-Verbindung Alanin sowie von Asparaginsäure und Glutaminsäure dargestellt. Die Konzentrationen betrugen jeweils 0,1 M/l. Die jeweilige Dipicolinsäureproduktion geht aus Tab. 1 hervor.

Wie Abb. 7 zeigt, fördern alle C_2-Verbindungen die Versporung im Vergleich zur Kontrolle in signifikanter Weise, während Alanin (C_3),

Asparaginsäure (C_4) und Glutaminsäure (C_5) auf die Sporenbildung einen hemmenden Einfluß ausüben. Der Befund bezüglich Alanin steht in Einklang mit den Beobachtungen anderer Autoren, die ebenfalls einen hemmenden Einfluß von Alanin auf die Sporenbildung feststellten [Grelet; Foster u. Heiligmann 1949 (1)]. In weitergehenden Untersuchungen konnte Grelet nachweisen, daß bei Gegenwart von Alanin Versporung nur dann eintritt, wenn das vorgelegte Alanin von den wachsenden Bakterien verbraucht worden war.

Tabelle 1. *Gesamt-Dipicolinsäure-Produktion von B. megaterium-Vollsporen*

	Dipicolinsäure pro mg org. Substanz in γ
Standardnährboden	72
+ 0,1 M Na-Acetat	71
+ 0,1 M Na-Glykolat	132
+ 0,1 M Na-Glyoxylat	84
+ 0,1 M Na-Oxalat	65
+ 0,1 M Glycin	70

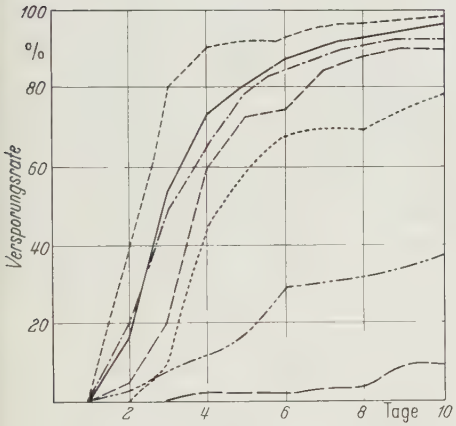


Abb. 7

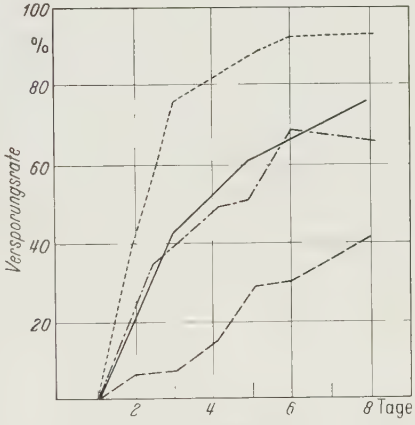


Abb. 8

Abb. 7. Versporungsraten von B. megaterium NCTC 7581 (Gibson) bei Anwesenheit von -------- Na-Glykolat; ——— Na-Glyoxylat; ·—·—· Na-Acetat; — — — Glycin; ····· Oxalat; — — — Na-Asparaginat, Na-Glutamat, Alanin; —··— Kontrolle

Abb. 8. Versporungsrate von B. megaterium NCTC 7581. — — — Kontrolle auf Standardnährboden; ····· Standardnährboden + 0,1 Mol Na-Glykolat; ——— Standardnährboden + 0,1 Mol Carboxymethylglutaminsäure; ·—·—· Standardnährboden + 0,1 Mol Carboxymethylglutaminsäure + 1,5‰ Bromsulfalein

Die auffällige Wirkung der Glutaminsäure, die Versporung zu hemmen, jedoch in Gegenwart von Glucose zu begünstigen, wurde auch schon von Foster u. Heiligmann [1949 (1)] an B. cereus festgestellt. Alanin und etwas weniger auffällig Asparaginsäure hemmten dagegen (Foster u. Mitarb.) die Versporung auch bei gleichzeitigem Zusatz von Glucose und Glutaminsäure.

Die zentrale Rolle, die die Glutaminsäure im Bakterienstoffwechsel, besonders bei grampositiven Bakterien, spielt (Taylor), legte es nahe noch weitere Untersuchungen in dieser Richtung anzustellen. Nach den

Befunden von Cavallero u. Meloni verhindert der Glutaminaseinhibitor Bromsulfalein die Auskeimung von Sporen von B. subtilis und B. cereus, wobei die Hemmung durch Zusatz von Glutaminsäure, jedoch nicht von Asparaginsäure, rückgängig gemacht werden kann.

Um den Einfluß dieses Fermentinhibitors auf die Versporung zu prüfen, wurden in gleicher Weise die Versporungsraten von B. mega-

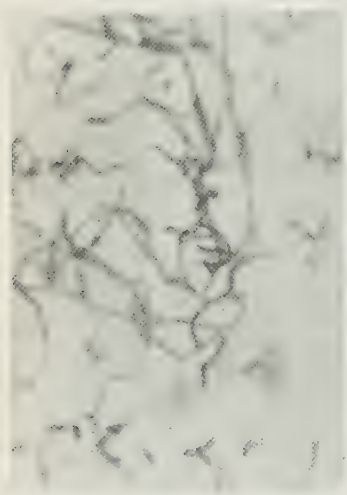


Abb. 9

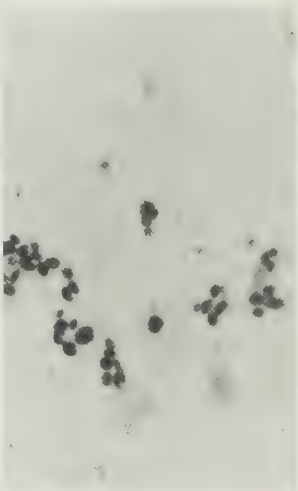


Abb. 10

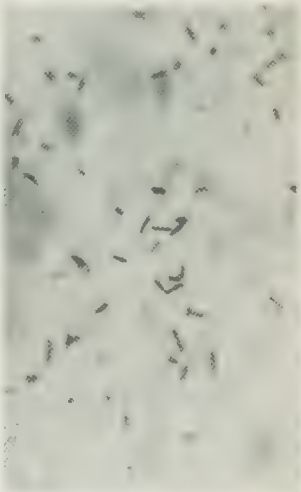


Abb. 11

Abb. 9. Fadenbildung als Ausdruck der Teilungshemmung durch Bromsulfalein bei B. megaterium NCTC 7581

Abb. 10. Involutionsformen von B. megaterium NCTC 7581 bei Kultur auf Standardnährboden bei gleichzeitigem Zusatz von Glutaminsäure und Bromsulfalein

Abb. 11. B. megaterium NCTC 7581, normale Morphologie. Reichert Zetopan; Reichert Achromat 100×, N. A. 1,30 Planokular 8×. Zeiss-Aufsetzkamera

terium bei Gegenwart von 1,5‰ Bromsulfalein bestimmt. Als Zusatz zum Grundnährboden wurde einmal Glykolsäure, ein andermal Glutaminsäure und weiter auch die möglicherweise als Vorstufe der Dipicolinsäure in Betracht zu ziehende (siehe unten) Carboxymethylglutaminsäure untersucht. Die Resultate sind in Abb. 8 dargestellt.

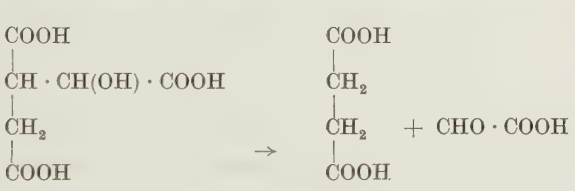
Wie aus der Abbildung ersichtlich, werden in Gegenwart von Bromsulfalein Sporen praktisch überhaupt nicht gebildet; auch die Förderung der Versporung durch Glykolsäure wird fast ganz aufgehoben. Diese Versporungshemmung durch Bromsulfalein wird durch Glutaminsäure nicht beeinflußt, kann aber durch Zusatz von Carboxymethylglutaminsäure aufgehoben werden. Es muß an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß, während Cavallero u. Meloni keinen Einfluß von Bromsulfalein auf das vegetative Wachstum von B. subtilis und B. cereus fanden, bei B. megaterium im mikroskopischen Bild Teilungsstörungen der Bakterien im Sinne von Fadenbildung nachzuweisen sind (Abb. 9).

Setzt man außer Bromsulfalein noch Glutaminsäure zu, dann bilden sich Involutionsformen, die morphologisch den unter subbakteriostatischer Penicillineinwirkung entstehenden gleichen (Abb. 10).

Die normale Morphologie der vegetativen Formen ist in Abb. 11 vergleichsweise wiedergegeben.

Auf die Untersuchungen von Gale über die Störung der Glutaminsäureaufnahme von Staphylococcus aureus-Zellen bei Gegenwart von Penicillin sei an dieser Stelle hingewiesen.

Die signifikante Förderung der Sporenbildung bei B. megaterium durch C_2-Verbindungen legt den Schluß nahe, daß diese über ein gemeinsames Zwischenprodukt an der Dipicolinsäure-Synthese und damit an der Sporenbildung beteiligt sind. Die Verbindung, die am leichtesten und auf kürzestem Wege aus den in Frage kommenden C_2-Verbindungen entstehen kann, ist die Glyoxylsäure. Kornberg u. Krebs konnten in mit Ammoniumacetat als alleiniger Kohlenstoffquelle gewachsenen Zellen von Pseudomonas KB 1 die Existenz eines zweiten Cyclus innerhalb des Citronensäurecyclus nachweisen, wobei aus Isocitrat durch das Ferment Isocitratase Succinat und Glyoxylat gebildet werden (Olson).



Isocitronensäure Bernsteinsäure Glyoxylsäure

Die Existenz des Glyoxylsäure-by-pass wurde für eine Reihe von Mikroorganismen und Pflanzen sichergestellt, während er im Säugetierorganismus nicht nachgewiesen werden konnte (Karlson).

Für die meisten der bisher untersuchten Mikroorganismen ist die Isocitratase ein adaptatives Ferment (Leiner), das nur bei Wachstum auf bestimmten Nährsubstraten, vorzugsweise acetathaltigen, gebildet wird (Kornberg, Gotto u. Lund; Reeves u. Ajl).

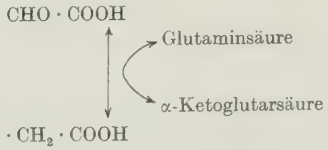
Außer aus Acetat auf dem Wege über den Glyoxylsäurecyclus kann Glyoxylsäure aber auch aus anderen C_2-Verbindungen gebildet werden. So konnten Zelitch u. Ochoa in Spinatblättern eine Glykolsäureoxydase nachweisen, die Glykolsäure zu Glyoxylsäure oxydiert.

$$\underset{\text{Glykolsäure}}{CH_2OH \cdot COOH} \rightarrow \underset{\text{Glyoxylsäure}}{CHO \cdot COOH}$$

Kornberg u. Gotto fanden Glykolsäureoxydase in zellfreien Extrakten von Pseudomonas ovalis Chester, Corpe u. Stone in Extrakten von Penicillium chrysogenum.

Glycin kann durch oxydative Desaminierung oder durch Transaminierung ebenfalls in Glyoxylsäure übergehen.

$$\underset{\text{Glycin}}{H_2N \cdot CH_2 \cdot COOH} + H_2O \rightarrow \underset{\text{Glyoxylsäure}}{CHO \cdot COOH} + NH_3 + 2H$$



(Fry; Lamanna u. Malette).

Die Existenz dieser Reaktion bei Bakterien wurde von verschiedenen Autoren bei Pseudomonaden nachgewiesen (Janke u. Thayenthal; Callely u. Dagley).

Die Reduktion von Oxalsäure zu Glyoxylsäure auf dem Wege über das Oxalyl-Coenzym A mittels DPN·H als Wasserstoffdonator wurde ebenfalls an Pseudomonas ovalis studiert (Quayle u. Keech).

$$\underset{\text{Oxalsäure}}{COOH \cdot COOH} \rightarrow \underset{\text{Glyoxylsäure}}{CHO \cdot COOH}$$

Um das Vorkommen der verschiedenen die Bildung der Glyoxylsäure bewirkenden Fermentsysteme nachzuweisen, wurden zellfreie Homogenate von im Stadium der Vorsporenbildung befindlichen Zellen von

Tabelle 2

Fermentaktivitäten von Homogenaten von B. megaterium im Vorsporenstadium

Spez. Aktivität = Einheiten pro mg Protein im Homogenat

Ferment	Spez. Aktivität	bestimmt nach
Isocitratase	0,12	Dixon u. Kornberg
Glykolsäure-Oxydase	0,14	Clagett et. al.
Glycinoxydase	0,07	Storck u. Wachsmann
Succinatoxydase	0,04	Storck u. Wachsmann

B. megaterium untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Wie die Tabelle zeigt, konnten in den Homogenaten von B. megaterium die Fermente bzw. Fermentsysteme nachgewiesen werden, die zur Bildung von Glyoxylsäure führen. Aus den Untersuchungen geht außerdem hervor, daß die Isocitratase bei B. megaterium kein adaptatives Ferment ist, sondern von den Keimen auch bei Züchtung unter Standardbedingungen gebildet wird. Wahrscheinlich wird auch beim normalen Ablauf der Versporung die dazu benötigte Glyoxylsäure auf dem Weg über den Glyoxylsäurecyclus nachgeliefert. Weiter konnte

festgestellt werden, daß Glyoxylsäure bei Inkubation mit Glutaminsäure auch in Abwesenheit von Bakterienhomogenaten eine Transaminierungsreaktion eingeht, womit die Befunde von NAKADA u. WEINHOUSE bestätigt werden konnten.

Neben den möglicherweise als Stoffwechselzwischenprodukte in Frage kommenden C_2-Verbindungen wurde auch Oxaminsäureäthylester hinsichtlich einer Beeinflussung der Sporenbildung durch diese Verbindung geprüft. Oxaminsäure ist als starker Inhibitor der Lactat-dehydrogenase seit längerer Zeit bekannt (COLOWICK u. KAPLAN). Oxaminsäureäthylester wurde in den Konzentrationen 0,01 M/l und 0,05 M/l dem Standardnährboden zugesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3
Versporung von B. megaterium (Meg 106) in Anwesenheit von Oxaminsäureäthylester

	Versporung nach 96 Std in Prozent	Gesamt-DPS pro mg org. Substanz in γ	abgegebene DPS nach 20 min Erhitzen auf 100° C in Prozent
Standardnährboden	97	74	16,4
Mit Zusatz von Oxaminsäureäthylester			
0,01 M/l	96	78	50,2
0,05 M/l	0	0	0

Wie aus den Befunden hervorgeht, hat Oxaminsäureäthylester in einer Konzentration von 0,01 M/l keinerlei Einfluß auf die Versporungsrate und auf die Menge der gebildeten Dipicolinsäure. 0,05 M/l verhindern dagegen die Sporenbildung und auch die Dipicolinsäureproduktion völlig, während das vegetative Wachstum unbeeinflußt blieb.

Wenn auch Versporungsrate und Dipicolinsäuregehalt der B. megaterium-Sporen durch Anwesenheit von Oxaminsäureäthylester in einer Konzentration von 0,01 M/l nicht geändert werden, so unterscheiden sich die so gewonnenen Sporen bezüglich der Leichtigkeit der Dipicolinsäureabgabe beim Erhitzen in wäßriger Suspension erheblich von den unter Standardbedingungen gebildeten Sporen. Beim Erhitzen einer wäßrigen Sporensuspension im kochenden Wasserbad für 20 min geben die bei Gegenwart von Oxaminsäureäthylester gebildeten Sporen 50,2% ihrer Dipicolinsäure an das Wasser ab, während die zum Vergleich dienenden, auf Standardnährböden gebildeten Sporen nur 16,4% ihrer Gesamtdipicolinsäure verlieren.

Verschiedene Untersuchungen ergaben übereinstimmend eine Abhängigkeit der Dipicolinsäureabgabe beim Erhitzen in wäßriger Suspension vom Calciumgehalt der Sporen (SLEPECKY u. FOSTER; HALVORSON u. CHURCH). Im vorliegenden Falle kann Verminderung des Calciums nicht als Ursache für das verschiedene Verhalten der Oxaminsäure- und

der Standardsporen angesehen werden, da einerseits der Calciumgehalt der Nährböden völlig gleich war und andererseits das UV-Spektrum der nach Abzentrifugieren erhaltenen wäßrigen Lösung die für Calciumdipicolinat charakteristischen Absorptionsbanden zeigt (Abb. 12).

In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Gollakota u. Halvorson wurde der Einfluß von Oxaminsäureäthylester auf die Versporung von B. cereus untersucht. Diese Autoren konnten ebenfalls keinen Einfluß des

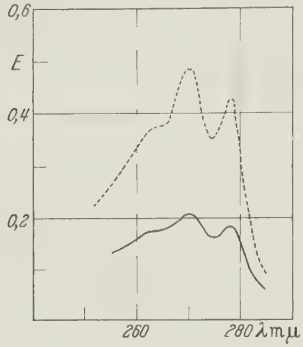


Abb. 12

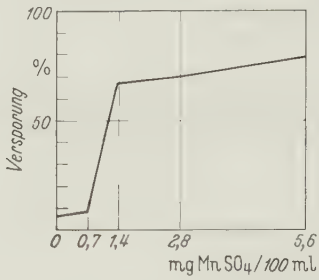


Abb. 13

Abb. 12. UV-Spektren des Überstandes einer B. megaterium-Sporensuspension nach 10 min Erhitzen auf 100° C. ——— Sporen, gezüchtet auf Standardnährboden; -------- Sporen, gezüchtet auf Standardnährboden mit 0,01 Mol Oxaminsäureäthylester

Abb. 13. Einfluß des Mangangehaltes des Nährbodens auf die Versporung von B. megaterium

Oxaminsäureäthylesters in einer Konzentration von 0,01 M auf die Versporungsrate sowie auf die Morphologie und das färberische Verhalten der B. cereus-Sporen feststellen; die Sporen enthielten aber *keine Dipicolinsäure*. In eigenen Untersuchungen gelang es bisher nicht, auf diese Weise dipicolinsäurefreie B. megaterium-Sporen zu erhalten; bei höheren Konzentrationen von Oxaminsäureäthylester trat immer Hemmung der Versporung und der Dipicolinsäurebildung ein.

Als für die Versporung unbedingt erforderliches Spurenelement wurde von Charney, Fisher u. Hegarty sowie von Slepecky u. Foster das Mangan erkannt, während Tomcsik u. Baumann-Grace keine Anhaltspunkte für die Notwendigkeit der Anwesenheit von Mangan für die Versporung von B. megaterium finden konnten. Allerdings waren die von Tomcsik untersuchten Mangankonzentrationen wesentlich niedriger als in den Versuchen der amerikanischen Autoren. Eigene Untersuchungen über die Versporungsrate auf dem im methodischen Teil beschriebenen Standardnährboden bei Variation der Mangankonzentration sind in Abb. 13 dargestellt.

Die Befunde, welche die Notwendigkeit von Mangan für die Versporung erweisen, konnten in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden. Die geringe Versporung ohne Manganzusatz (Abb. 13)

dürfte darauf zurückzuführen sein, daß es trotz aller Vorsichtsmaßnahmen und Verwendung reinster Chemikalien für die Nährböden praktisch nicht möglich war, Manganspuren völlig zu vermeiden.

Da Mangan unter anderem als notwendiges Element für die Oxydation von Glykolsäure zu Glyoxylsäure in höheren Pflanzen erkannt wurde (Tanner u. Mitarb.), wurde die Oxydation von Glykolsäure durch vegetative Zellen von B. megaterium im Warburg-Apparat bei An- und Abwesenheit von Mangan untersucht. Der Sauerstoffverbrauch der Bakterien unter Berücksichtigung der endogenen Atmung ist in Abb. 14 dargestellt. Wie ersichtlich, sind die Bakterienzellen nur in Gegenwart von Mangan imstande, Glykolsäure zu oxydieren; das Volumen des verbrauchten Sauerstoffs entspricht der zur Oxydation zu Glyoxylsäure benötigten Menge. Bei Richtigkeit der Annahme, daß das Mangan als Spurenelement im Zusammenhang mit der Glyoxylsäureproduktion steht, müßte auch auf manganfreien Nährböden nach Zusatz von Glyoxylsäure eine Versporung zu erzielen sein. Wie Tab. 4 zeigt, trifft dies auch weitgehend zu. Bei gleichzeitigem Zusatz von Glutaminsäure kann auch bei Abwesenheit von Mangan eine praktisch gleich gute Versporung erreicht werden wie bei Anwesenheit dieses Elementes. Wenn

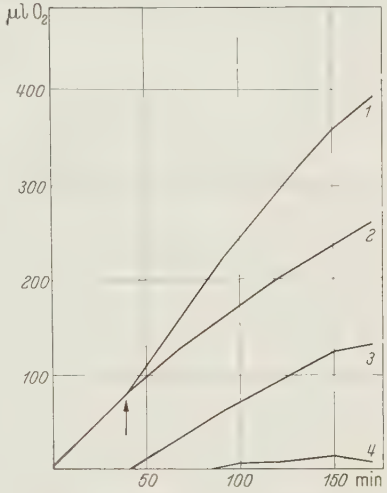


Abb. 14. Atmungskurven nach Warburg von B. megaterium. *1* Bacillensuspension in 0,015 M PO_4-Puffer + 10 µMol Na-Glykolat + 10 µM $MnSO_4$; *2* Bacillensuspension, ohne Mangan und Na-Glykolat (endogene Atmung); *3* O_2-Verbrauch nach Abzug der endogenen Atmung: *4* O_2-Verbrauch nach Abzug der endogenen Atmung bei Abwesenheit von Mangan. Bei ↑ Einkippen der Manganlösung

Tabelle 4. *Versporung von B. megaterium (Meg 106) nach 72 Std*

Standardnährboden ohne Mangan	22% Versporung
Mit Zusatz von 0,1 M/l Glyoxylsäure	57% Versporung
0,1 M/l Glyoxylsäure + 0,1 M/l Glutaminsäure	88% Versporung
Standardnährboden mit 50 mg $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ pro Liter	94% Versporung

auch die Glykolsäureoxydation nicht an erster Stelle für den normalen Ablauf der Glyoxylsäurebildung maßgebend sein dürfte, so könnte sie doch zur Erklärung der Tatsache beitragen, daß bei Anwesenheit von Glykolsäure gebildete Sporen besonders reich an Dipicolinsäure sind

(vgl. auch Martin u. Foster). Weitere Möglichkeiten des Manganeinflusses auf die Sporenbildung werden später besprochen.

Rode u. Foster konnten nachweisen, daß die in den Sporen vorhandene Dipicolinsäure schon bei sorgsamster Aufarbeitung abgegeben werden kann. So wurde schon bei der mechanischen Zerstörung von Sporen in der Kälte oder auch, um jede Fermentaktivität sicher auszu-

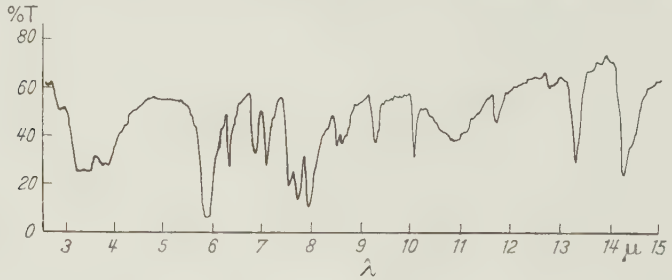


Abb. 15. Infrarot-Spektrum von Dipicolinsäure in KBr-Preßling

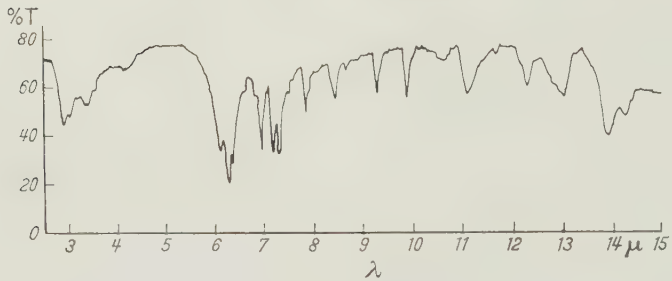


Abb. 16. Infrarot-Spektrum von Ca-Dipicolinat in KBr-Preßling

schalten, in Gegenwart von Äthylalkohol die gesamte Dipicolinsäure in der löslichen Fraktion und nicht an Wandstrukturen gebunden angetroffen. Diese Befunde konnten in eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Darüber hinausgehend wurde versucht, Dipicolinsäure auch in unzerstörten, lebensfähigen Sporen nachzuweisen, um mit größtmöglicher Sicherheit ausschließen zu können, daß die Dipicolinsäure vielleicht erst bei der Keimung oder bei die Lebensfähigkeit der Sporen beeinträchtigenden Eingriffen physikalischer oder chemischer Natur aus einer bisher noch nicht isolierten, im freien Zustand instabilen Vorstufe gebildet wird.

Infolge des hohen Brechungsindex der im Ruhezustand befindlichen Spore ist eine direkte UV-spektroskopische Untersuchung von Sporensuspensionen nicht möglich, da der Streulichtanteil den Absorptionsanteil so stark überdeckt, daß letzterer nicht mehr gemessen werden kann. Auch

bei Verwendung von diffusem Licht (Bateman u Monk; Shibata, Benson u. Calvin) oder durch Zusatz von Glycerin zur Sporensuspension zur Erhöhung des Brechungsindex des Mediums waren auswertbare UV-Absorptionsspektren nicht zu erhalten; UV-Spektren der reinen Dipicolinsäure und einiger ihrer Salze sind im methodischen Teil dargestellt. Daher wurde versucht, die Dipicolinsäure in den intakten Sporen mit

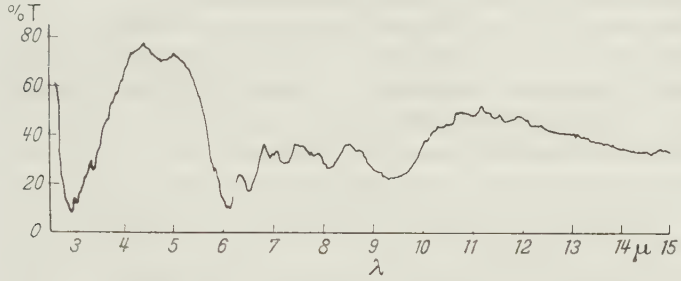


Abb. 17. Infrarot-Spektrum von B. megaterium, vegetative Zellen, in KBr-Preßling

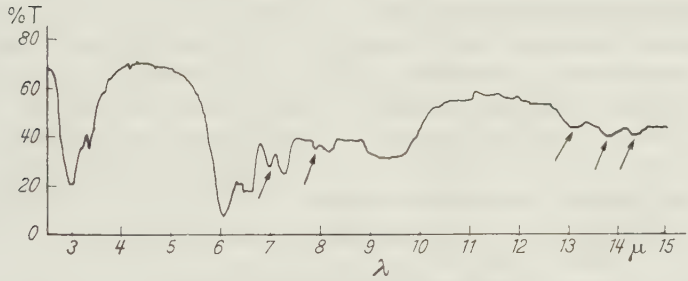


Abb. 18. Infrarot-Spektrum von B. megaterium in KBr-Preßling. Erklärung siehe Text

Hilfe der Infrarot-Spektrometrie und der Röntgenspektren nachzuweisen.

Wie die Abb. 15 und 16 zeigen, sind die Infrarotspektren von Dipicolinsäure und Calciumdipicolinat sowohl in bezug auf die Lage der Banden als auch auf die relativen Intensitäten deutlich different. Wenn auch in den Sporen nicht die gesamte Dipicolinsäure als Calciumsalz vorliegen dürfte, so wird dies wohl für den größten Teil zutreffen, wie sich aus den UV-Spektren der beim Erhitzen von wäßrigen Sporensuspensionen erhaltenen Lösungen ergibt (siehe oben).

Wie die Abb. 17 und 18 zeigen, sind die Infrarot-Spektren der Sporen und der vegetativen Zellen, wie zu erwarten war, einander wohl sehr ähnlich. Ein genauer Vergleich zeigt aber, daß im langwelligen Bereich, in dem bei den vegetativen Zellen keinerlei Absorptionsbanden feststellbar sind, bei den Sporen drei allerdings nur unscharf ausgeprägte Maxima bei 13,0, 13,8 und 14,3 μ vorhanden sind (siehe Abb. 18). Außerdem ist

im Spektrum der Sporen noch ein kleines Maximum bei 7,9 μ feststellbar. Ferner ist die Zacke bei 7,0 μ wesentlich stärker ausgeprägt. Dagegen war das Maximum bei 5,7—5,8 μ, das nach den Untersuchungen verschiedener Autoren (Hayes; Blackwood) auf das Vorkommen der β-Oxybuttersäure-Lipoide zurückzuführen ist, nicht nachweisbar, obwohl die untersuchten Bakterien nach Lipoidfärbung mit Sudanschwarz in den vegetativen Zellen reichlich Lipoideinlagerung zeigten.

Da die Deutung der Infrarot-Spektren von Bakterien wegen der Komplexität der Zellbausteine und der Vielzahl der in den Zellen vorhandenen Verbindungen schwierig und manchmal auch unsicher ist (Levine, Stevenson, Chambers u. Kenner; Riddle, Kabler, Kenner, Bordner, Rockwood u. Stevenson), können Schlüsse aus den vorliegenden Spektren nur mit Vorsicht gezogen werden. Mit diesem Vorbehalt kann ausgesagt werden, daß die Dipicolinsäure in den Sporen schon vorgebildet vorliegt und nicht erst bei der Keimung oder bei der Abtötung aus einer Vorstufe gebildet wird. Dieses Ergebnis steht auch mit den oben erwähnten Resultaten von Rode u. Foster in Einklang.

Röntgen-Pulverdiagramme nach Debye-Scherrer von lebensfähigen und 10 min auf 180° C erhitzten B. megaterium-Sporen zeigten auch bei sehr langer Belichtung (3 Std) keinerlei für eine kristalline Struktur sprechenden Interferenzen. Dipicolinsäure und Calcium-Dipicolinat lieferten dagegen typische Kristalldiagramme. Dipicolinsäure liegt also weder in lebensfähigen noch in erhitzten Sporen in kristalliner Form vor, womit die Befunde von Powell (1957) vollinhaltlich bestätigt werden konnten.

Besprechung der Ergebnisse

Es scheint durch die verschiedenen Untersuchungen über den Gehalt an Dipicolinsäure in den Sporen bestimmter Bacillen sicher, daß Dipicolinsäure lediglich in Sporen vorkommt und sich in den vegetativen Formen und den Vorsporen nicht findet, ein Ergebnis, das durch eigene Untersuchungen vollinhaltlich bestätigt werden konnte. Wie weit das Vorkommen von Dipicolinsäure in den Sporen mit der Hitzeresistenz in Zusammenhang steht, läßt sich bisher wohl nur vermuten, wenn auch schwerwiegende Anhaltspunkte in dieser Richtung vorliegen (Braams). Immerhin hat die Dipicolinsäuretheorie der Hitzeresistenz der Sporen den großen Vorteil, daß hier erstmalig eine chemisch erfaßbare Substanz nachgewiesen werden konnte, die ausschließlich in den Bacillen- und Clostridiensporen vorkommt und nicht in den zugehörigen vegetativen Formen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß Dipicolinsäure ähnlich wie Äthylendiamintetraessigsäure zur Chelatbildung neigt (Suzuki u. Yamasaki). Powell u. Strange (1956) stellen die Hypothese zur Diskussion, daß die Dipicolinsäure bzw. ihr Calcium-

salz mit dem Sporeneiweiß eine Komplexbindung eingeht und daß dieser Komplex für die erhöhte Hitzeresistenz verantwortlich zu machen sei.

Als Stütze für die genannte Hypothese könnte die Tatsache gewertet werden, daß die Sporen im ersten Stadium der Keimung die Dipicolinsäure an das Medium abgeben, wobei sie ihre Hitzeresistenz verlieren.

Die eigenen Untersuchungen haben sich in erster Linie mit der Biosynthese der Dipicolinsäure beschäftigt. Wie einleitend bereits berichtet wurde, werden in der Literatur grundsätzlich zwei Möglichkeiten für die Synthese der Dipicolinsäure diskutiert, einerseits die Möglichkeit des Ringschlusses bei der α, ε-Diaminopimelinsäure bzw. α, ε-Diketopimelinsäure, andererseits die Möglichkeit der Kondensation aus C_3-(Brenztraubensäure bzw. Alanin) und C_4-Stücken (Oxalessigsäure bzw. Asparaginsäure).

Gegen die Annahme der Bildung der Dipicolinsäure aus der Diaminopimelinsäure durch Ringschluß spricht das Fehlen der Substanz in der Fraktion der freien Aminosäuren sowohl in den vegetativen Zellen als auch in der Spore; Diaminopimelinsäure ließ sich bisher lediglich in Hydrolysaten der Wandstrukturen verschiedener Sporen und auch bei nicht sporenbildenden Bakterien nachweisen. Auch die Versuche von Perry u. Foster (2955) mit radioaktiv markierter α, ε-Diaminopimelinsäure zeigten, daß diese nur in geringem Grade in Dipicolinsäure eingebaut wird [vgl. Martin u. Foster 1958 (2)].

Ein gewisser Einwand gegen die Bildung der Dipicolinsäure durch Kondensation aus C_3- und C_4-Stücken ist aus der Tatsache abzuleiten, daß die Versporung durch C_3-Stücke (Alanin) nicht nur nicht gefördert, sondern sogar gehemmt wird. Im Gegensatz dazu wird die Versporung von B. megaterium durch C_2-Verbindungen in signifikanter Weise gefördert, wie die vorliegenden Untersuchungen in eindeutiger Weise zeigen (vgl. Abb. 7).

Auf Grund dieser Beobachtungen ist eher anzunehmen, daß die Bildung der Dipicolinsäure in den Sporen leichter und schneller und somit wahrscheinlicher durch Kondensation aus einer C_2- und C_5-Verbindung entsteht. Als C_5-Stücke kämen in erster Linie Glutaminsäure und α-Ketoglutarsäure in Betracht. Diese Annahme erfährt schon dadurch eine Stütze, daß — wie schon lange bekannt — die Glutaminsäure ganz allgemein eine zentrale Stellung im Bakterienstoffwechsel einnimmt (Gale), während die Asparaginsäure (C_4) immer nur in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte. Die α-Ketoglutarsäure steht in engem Zusammenhang mit Glutaminsäure, da die beiden Säuren durch Transaminierung leicht ineinander übergehen können und die Bakterien entsprechende Transaminasen (Campbell jr.) enthalten. Als C_2-Verbindungen kämen Glycin, Glykolsäure, Glykolaldehyd, Glyoxylsäure, Oxalsäure und Essigsäure in Betracht. Mit Ausnahme von Glykolaldehyd

wurden alle geprüft; wie aus der Abb. 7 hervorgeht, sind diese Stoffe imstande, die Versporung und damit die Dipicolinsäurebildung wesentlich zu fördern. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß durch Oxydation von Glykolsäure bzw. durch oxydative Desaminierung von Glycin bzw. durch Transaminierung von Glycin Glyoxylsäure gebildet wird. Damit ergibt sich ein Zusammenhang mit dem Glyoxylsäurecyclus und damit auch mit dem Citronensäurecyclus. Es scheint also, daß die Glyoxylsäure unter den C_2-Verbindungen hinsichtlich der Versporung eine zentrale Stellung einnimmt. Im Glyoxylsäurecyclus wird die Glyoxylsäure aus Isocitronensäure durch das Ferment Isocitratase neben Bernsteinsäure gebildet.

Durch die vorliegenden Untersuchungen wurde bestätigt, daß Glutaminsäure auch ohne Fermente mit Glyoxylsäure transaminiert. Diese Transaminierung kann nur unter Bildung eines Azomethins (vgl. Schema 1) als Zwischenprodukt erfolgen. Bei der Sporenbildung kommt es offenbar nicht zur Vollendung der Transaminierung, sondern es tritt unter Wasserabspaltung Ringschluß des Azomethins zur 3-Oxy-4,5-dihydropyridin-2,6-dicarbonsäure ein. Diese Verbindung könnte in Dipicolinsäure durch Reduktion und Dehydrierung übergehen. Wenn auch dieser Nachweis trotz zahlreicher Versuche in der vorliegenden Untersuchung noch nicht geglückt ist, so sprechen viele Gründe dafür, daß die Biosynthese der Dipicolinsäure bei B. megaterium tatsächlich auf diesem Wege verläuft. Entsprechende Ringschlüsse sind aus der Biochemie der Heterocyclen bekannt, wie z. B. die Biosynthese der Uracil-4-carbonsäure (Orotsäure, Karlson) oder der kürzlich von Mothes u. Mitarb. erbrachte Nachweis, daß C^{14}-markierte Asparaginsäure von Mycobacterium tuberculosis (BCG-Stamm) in Nicotinsäure übergeführt wird. Zwischenprodukte wurden hierbei bisher nicht isoliert.

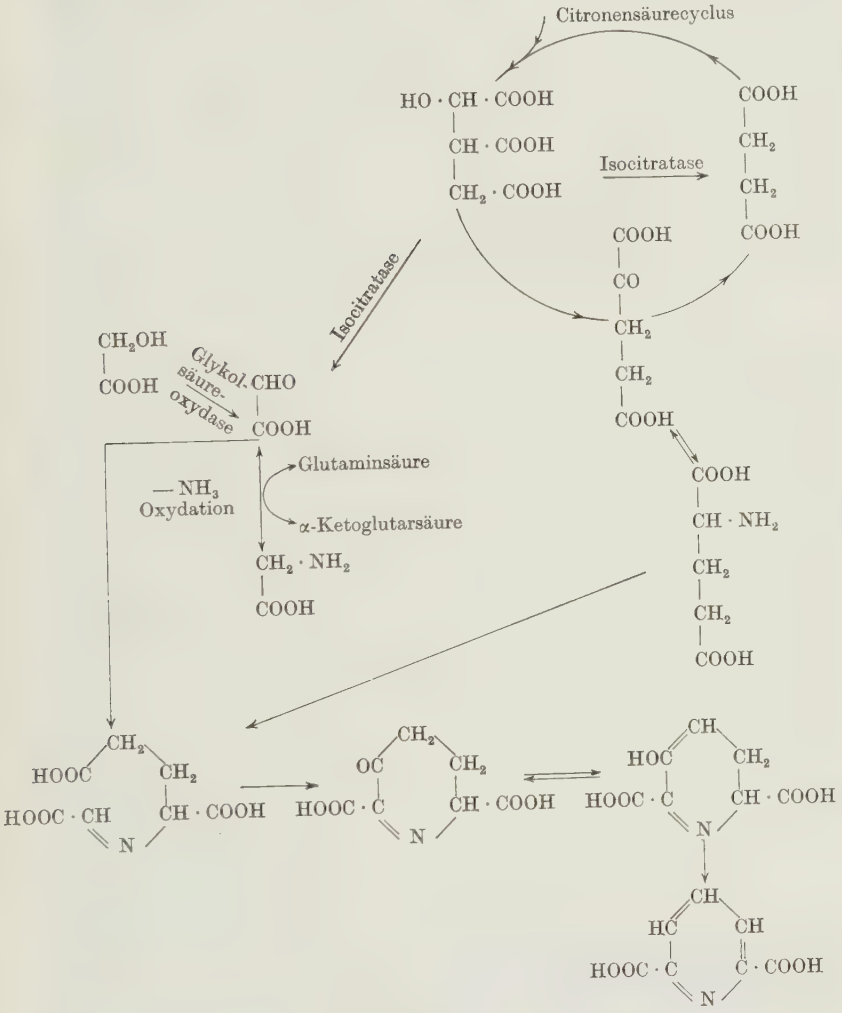
Schließlich beweisen die Befunde von Powell u. Strange (1959), daß bei Eintritt des Ringschlusses aus α, ε-Diketopimelinsäure mit Ammoniumacetat unter milden Bedingungen ohne Anwesenheit von Bakterien oder Fermenten spontane Dehydrierung zur Dipicolinsäure eintritt. Auch die Untersuchungsergebnisse von Grimshaw u. Marion über die Biosynthese des Pyridinringes (siehe oben) sprechen für die Wahrscheinlichkeit des vorgeschlagenen Weges der Biosynthese der Dipicolinsäure.

Zur Erklärung der Biosynthese der Dipicolinsäure wird nach den vorstehenden Untersuchungen das Schema 1 vorgeschlagen:

Die Rolle des Mangans bei der Sporenbildung bedarf schließlich noch einer kurzen Besprechung. Chraney et al. sowie Hardwick u. Foster stellten bei ihren Versuchen eine Vermehrung der Proteinasen in Gegenwart von Manganionen fest.

Dieser Befund konnte von Amaha et al. nicht bestätigt werden; diese Autoren fanden aber bei Untersuchungen mit Bac. coagulans var. thermo-

acidurans, Stamm 43 P-1, einen Zusatz von Mangan allein für eine hohe Versporungsrate nicht ausreichend; ein hoher Prozentsatz an Sporen konnte aber bei gleichzeitigem Zusatz von Apfelsäure, α-Ketoglutarsäure,



Schema 1

Bernsteinsäure oder Isocitronensäure erhalten werden. Diese Versuche sprechen eindeutig dafür, daß der Citronensäurecyclus bei der Versporung eine wesentliche Rolle spielt. Die Manganabhängigkeit der Aktivität einiger Fermente des Citronensäurecyclus ist schon längere Zeit bekannt;

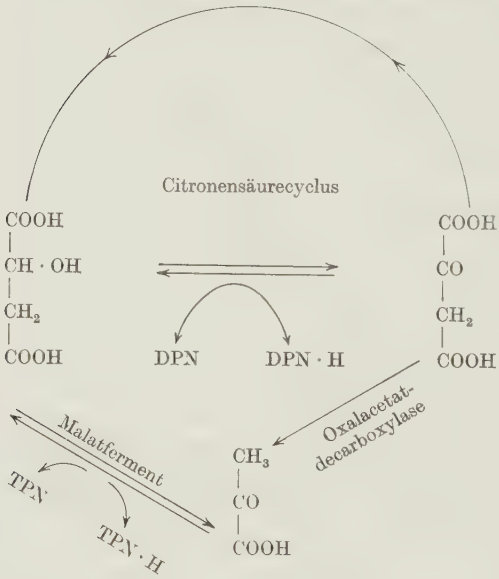
so wird die Oxalbernsteinsäuredecarboxylase durch Mn^{++} aktiviert (Ochoa). Auch das von Ochoa u. Mitarb. erstmalig in der Leber, später auch in Mikroorganismen (Krebs u. Lowenstein) nachgewiesene Malat-Ferment, das unter Verwendung von TPN · H Pyruvat unter gleichzeitiger Reduktion der Ketogruppe unter Anlagerung von CO_2 zu Apfelsäure carboxylieren kann, wird durch Manganionen aktiviert.

$$CH_3 \cdot CO \cdot COOH + CO_2 + TPN \cdot H + H^+ \rightarrow HO_2C \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot CO_2H + TPN$$

Brenztraubensäure — Apfelsäure

Der Zusammenhang des Malatfermentes mit dem Citronensäurecyclus ist im Schema 2 dargestellt.

Die vorliegenden Ergebnisse beweisen die Notwendigkeit von Mangan als Spurenelement für die Versporung und damit auch für die Dipicolinsäure-Synthese bei B. megaterium. Außerdem geht daraus hervor, daß die Anwesenheit von Mangan nicht mehr notwendig ist, wenn Glyoxylsäure und Glutaminsäure bereits vorgebildet vorliegen.



Schema 2

Wenn auch die Mangan-Abhängigkeit der Glykolsäureoxydation zu Glyoxylsäure bei B. megaterium nachgewiesen werden konnte, so ist doch wahrscheinlich der Weg über die Glykolsäure nur als Sonderfall anzusehen, da im allgemeinen die Nachlieferung der benötigten Glyoxylsäure über den Citronensäure-Glyoxylsäurecyclus erfolgen dürfte. An welcher Stelle bzw. an welchen Fermenten oder Fermentsystemen hier die Manganwirkung einsetzt, konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden, wenn auch die Tatsache an sich feststeht.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einen Einblick in die Biosynthese der Dipicolinsäure bei der Versporung von Bac. megaterium zu gewinnen.

Es wurde nachgewiesen, daß bei B. megaterium ein enger Zusammenhang zwischen Dipicolinsäuresynthese und Versporung besteht. Wenn auch die Biosynthese der Dipicolinsäure auf mehreren Wegen erfolgen kann, so konnte an Hand der erhobenen Befunde gezeigt werden, daß die Biosynthese der Dipicolinsäure am raschesten, leichtesten und mit der besten Ausbeute von einer C_2- und einer C_5-Verbindung ausgehend vor sich geht, am wahrscheinlichsten unter Benützung von Glyoxylsäure und Glutaminsäure als Ausgangsmaterial.

Die seit längerem bekannte Wirkung des Mangans als für die Versporung notwendiges Spurenelement konnte auf eine bisher noch nicht näher bestimmbare Aktivierung von Fermenten des Citronensäurecyclus zurückgeführt werden. Bei Anwesenheit von Glykolsäure können die Bacillen jene nur in Gegenwart von Mangan zu Glyoxylsäure oxydieren.

Literatur

Amaha, M., Z. J. Ordal and A. Touba: Sporulation Requirements of Bacillus coagulans var. thermo-acidurans in Complex Media. J. Bact. **72**, 34 (1956).

Aubert, J. P., J. Millet, E. Pineau et G. Milhaud: Existence de l'acide N-succinyl-l-glutamique chez Bacillus megaterium en voie de Sporulation. C. R. Acad. Sci. (Paris) **249**, 1956 (1959).

Batemann, J. B., and G. W. Monk: Spectral Absorption of Turbid Systems Using Diffuse Light. Science **121**, 441 (1955).

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, p. 710. 6th Ed. Baltimore 1948.

Blackwood, A. C., and A. Epp: Identification of β-Hydroxybutyric Acid in Bacterial Cells by Infrared Spectrophotometry. J. Bact. **74**, 266 (1957).

Braams, R.: Radiat. Res. **12**, 114 (1960); zit. nach Angew. Chem. **72**, 641 (1960).

Byrne, A. F., T. H. Burton and K. B. Koch: Relation of Dipicolinic Acid Content of Anaerobic Bacterial Endospores to their Heat Resistance. J. Bact. **80**, 139 (1960).

Callely, A. G., and S. Dagley: Metabolism of Glycine by a Pseudomonad. Nature (Lond.) **183**, 1793 (1959).

Campbell, L. L.: The Oxydative Degradation of Glycine by a Pseudomonas. J. biol. Chem. **217**, 669 (1955).

Campbell, L. L., jr.: Transamination of Amino Acids with Glyoxylic Acid in Bacterial Extracts. J. Bact. **71**, 81 (1956).

Cavallero, F., e G. A. Meloni: L'azione di alcuni Inibitori Enzimatici sulla Germinazione delle Spore. Igiene Mod. **49**, 951 (1956).

Charney, J., W. P. Fisher and C. P. Hegarty: Manganese as an Essential Element for Sporulation in the Genus Bacillus. J. Bact. **62**, 145 (1951).

Church, B. D., and H. O. Halvorson: Dependence of the Heat Resistance of Bacterial Endospores on their Dipicolinic Acid Content. Nature (Lond.) **183**, 124 (1959).

Clagett, C. O., N. E. Tolbergt and R. H. Burris: Oxydation of α-Hydroxy-Acids by Enzymes from plants. J. biol. Chem. **178**, 977 (1949).

Cohen, P. P., and H. J. Sallach: Nitrogen Metabolism of Amino Acids. In: Greenberg, D. M: Metabolic Pathways, p. 40. New York 1961.

Colowick, S. P., and N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Vol. I, p. 453. New York 1955.

Corpe, W. A., and R. W. Stone: Oxydation of Glycolic Acid by Penicillium Chrysogenum. J. Bact. **80**, 452 (1960).

Curran, H. R., and F. R. Evans: The Influence of Iron or Manganese upon the Formation of Spores by Mesophilic Aerobes in Fluid Organic Media. J. Bact. **67**, 489 (1954).

Davies, F. L., jr., and O. B. Williams: Chromatographic Analysis of the Amino Acid Composition of Bacterial Spores. J. Bact. **64**, 766 (1952).

Dixon, G. H., and H. L. Kornberg: Assay Methods for Key Enzymes of the Glyoxylate Cycle. Biochem. J. **72**, 3p (1959).

Doak, B. W., and C. Lamanna: On the Antigenic Structure of the Bacterial Spore. J. Bact. **55**, 373 (1948).

Elderfield, R. C.: Heterocyclic Compounds, Vol. I, p. 465ff. New York 1950.

Foster, J. W.: Discussion on Powell, J. F.: Chemical Changes occuring during Spore Germination. In: Spores, p. 81. Ed. by H. O. Halvorson, Washington 1957.

Foster, J. W., and F. Heiligmann: (1) Biochemical Factors Influencing Sporulation in a Strain of Bacillus cereus. J. Bact. **57**, 639 (1949).

Foster, J. W., and F. Heiligmann: (2) Mineral Deficiencies in Complex Organic Media as limiting Factors in Sporulation of Aerobic Bacilli. J. Bact. **57**, 613 (1949).

Fry, B. A.: The Nitrogen Metabolism of Micro-Organisms, p. 10. London 1955.

Gale, E. F.: Synthesis and Organization in the Bacterial Cell, p. 24. London 1959.

Gollakota, K. G., and H. O. Halvorson: Biochemical Changes Occuring in Bacillus cereus during Sporulation. In: Halvorson, H. O.: Spores II, p. 113. Minneapolis 1961.

Grelet, N.: Nutrition Azotée et Sporulation de Bacillus cereus var. Mycoides. Ann. Inst. Pasteur **88**, 60 (1955).

Grimshaw, J., and L. Marion: The Pyridine Ring and the Problem of its Biosynthesis. Nature (Lond.) **181**, 112 (1958).

Halvorson, H., and B. Church: Biochemistry of Spores of Aerobic Bacilli with Special Reference to Germination. Bact. Rev. **21**, 116 (1957).

Halvorson, H. O., and C. Howitt: The Role of DPA in Bacterial Spores. In: Spores II, p. 149. Minneapolis 1961.

Hardwick, W. A., and J. W. Foster: On the Nature of Sporogenesis in some Aerobic Bacteria. J. gen. Physiol. **35**, 907 (1954).

Hayes, W. C., E. H. Melvin, J. M. Kocke, C. A. Glass and F. R. Senti: Appl. Microbiol. **6**, 298 (1958); ref. in Chem. Abstr. **52**, 18654i (1958).

Hess, K., u. F. Wissing: Synthese der N-Methyl-hexahydro-α-α′-lutidin-dicarbonsäure. Ber. dtsch. chem. Ges. **48**, 1908 (1915).

Janke, A., u. W. Thayenthal: Über den Abbau des Glykokolls durch Bakterien. Biochem. Z. **289**, 76 (1937).

Janssen, F., A. Lund and L. Anderson: Colorimetric Assay for Dipicolinic Acid in Bacterial Spores. Science **127**, 26 (1958).

Johnson, M. J.: A Rapid Micromethod for Estimation of Non-volatile Organic Matter. J. biol. Chem. **181**, 707 (1949).

Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, S. 167. Stuttgart: Thieme 1961.

Karmen, A.: A Note on the Spectrophotometric Assay of Glutamic-Oxalacetic Transaminase in Human Blood Serum. J. clin. Invest. **34**, 131 (1955).

Kindaichi, K.: Meikai Kokugo Jiten, p. 632. Tokyo 1961.

Korman, S., and H. T. Clarke: Carboxymethylamino Acids and Peptides. J. biol. Chem. **221**, 122 (1956).

Kornberg, H. L., and A. M. Gotto: Formation of Malate from Glykollate by Pseudomonas Ovalis Chester. Nature (Lond.) **183**, 1791 (1959).

Kornberg, H. L., A. M. Gotto and P. Lund: Effect of Growth Substrates on Isocitritase Formation by Pseudomonas ovalis Chester. Nature (Lond.) **182**, 1430 (1958).

Kornberg, H. L., and H. A. Krebs: Synthesis of Cell Constituents from C_2-Units by a Modified Tricarboxylic Acid Cycle. Nature (Lond.) **179**, 988 (1957).

Krebs, H. A., and J. M. Lowenstein: Tricarboylic Acid Cycle. In: Greenberg: Metabolic Pathways, Vol. I. New York 1960.

Krishna Murty, G. G., and H. O. Halvorson: Effect of Duration of Heating, l-Alanine and Spore Concentration on the Oxydation of Glucose by Spores of Bacillis cereus var. terminalis. J. Bact. **73**, 235 (1957).

Lamanna, C., and M. F. Malette: Basic Bacteriology, p. 551. Baltimore 1953.

Lawrence, N. L., and H. O. Halvorson: Studies on the Spores of Aerobic Bacteria. III. The D-Amino Acid Content of Spores and Vegetative Cells of Bacillus terminalis. J. Bact. **67**, 585 (1954).

Leiner, M.: Die enzymatische Anpassung bei Mikro-Organismen ohne Veränderung des Erbgutes. Ergebn. Mikrobiol. **31**, 35 (1958).

Levine, S., H. J. R. Stevenson, L. A. Chambers and B. A. Kenner: Infrared Spectrophotometry of Enteric Bacteria. J. Bact. **65**, 10 (1953).

Martin, H. H., u. J. W. Foster: (1) On the Chromatographic Behavior of Dipicolinic Acid. Arch. Mikrobiol. **31**, 171 (1958).

Martin, H. H., and J. W. Foster: (2) Biosynthesis of Dipicolinic Acid in Bacillus megaterium. J. Bact. **76**, 167 (1958).

Mellon, R. R., and L. M. Anderson: Immunologic Disparities of Spore and Vegetative Stages of Bacillus subtilis. J. Immunol. **4**, 203 (1919).

Metzler, D. E., J. Olivard and E. E. Snell: Transamination of Pyridoxamine and Amino Acids with Glyoxylic Acid. J. Amer. chem. Soc. **76**, 644 (1954).

Mothes, E., D. Gross, H. R. Schütze u. K. Mothes: Zur Biosynthese der Nicotinsäure bei Mycobacterium tuberculosis (Stamm BCG). Naturwissenschaften **48**, 623 (1961).

Nakada, H. I., and S. Weinhouse: Nonenzymatic Transamination with Glyoxylic Acid and various Amino Acids. J. biol. Chem. **204**, 831 (1953).

Nakata, H. M., and H. O. Halvorson: Biochemical Changes Occuring during Growth and Sporulation of Bacillus cereus. J. Bact. **80**, 801 (1960).

Ochoa, S. J.: Isocitric Dehydrogenase and Carbon Dioxide Fixation. J. biol. Chem. **159**, 243 (1945).

Ochoa, S. J.: Biosynthesis of Tricarboxylic Acids by Carbon Dioxide Fixation. J. biol. Chem. **174**, 133 (1948).

Ochoa, S., A. H. Mehler and A. Kornberg: Biosynthesis of Dicarboxylic Acids by Carbon dioxide Fixation. J. biol. Chem. **174**, 979 (1948).

Olson, J. A.: The d-iso-Citric Lyase System: The Formation of Glyoxylic and Succinic Acids from d-iso-Citric Acid. Nature (Lond.) **174**, 695 (1954).

Perry, J. J., and J. W. Foster: Studies on the Biosynthesis of Dipicolinic Acid in Spores of Bacillus cereus var. mycoides. J. Bact. **69**, 337 (1955).

Perry, J. H., and J. W. Foster: Monoethyl Ester of Dipicolinic Acid from Bacterial Spores. J. Bact. **72**, 295 (1956).

Powell, J. F.: Isolation of Dipicolinic Acid (Pyridine-2,6-dicarboxylic Acid) from Spores of Bacillus megaterium. Biochem. J. **54**, 210 (1953).

Powell, J. F.: Chemical Changes Occuring during Spore Germination. In: H.O. Halvorson: Spores, p. 72. Washington 1957.

Powell, J. F., and R. E. Strange: Biochemical Changes Occuring during the Germination of Bacterial Spores. Biochem. J. **54**, 205 (1953).

Powell, J. F., and R. E. Strange: Biochemical Changes Occuring during Sporulation in B. megaterium in Relation to Germination. Biochem. J. **63**, 661 (1956).

Powell, J. F., and R. E. Strange: Synthesis of Dipicolinic Acid from α,ε-Diketopimelic Acid. Nature (Lond.) **184**, 878 (1959).

Quayle, J. R., and D. B. Keech: Formation of Glycerate from Oxalate by Pseudomonas oxalaticus (OXI) Grown in Oxalate. Nature (Lond.) **183**, 1794 (1959).

Reeves, H. C., and S. Ajl: Occurence and Function of Isocitritase and Malate Synthetase in Bacteria. J. Bact. **79**, 341 (1960).

Riddle, J. W., P. W. Kabler, B. A. Kenner, R. H. Bordner, S. W. Rockwood and H. J. R. Stevenson: Bacterial Identification by Infrared Spectrophotometry. J. Bact. **72**, 593 (1956).

Rode, L. J., and J. W. Foster: Induced Release of Dipicolinic Acid from Spores of Bacillus megaterium. J. Bact. **79**, 650 (1960).

Salles, J. B. V., and S. Ochoa: Further Study of the Properties of the "malic" Enzyme of Pigeon Liver. J. biol. Chem. **187**, 849 (1950).

Schlossberger, H.: Über das Verhalten der Chromatinsubstanz und die antigenen Eigenschaften der Sporen von Bacillus sphaericus. Schweiz. Z. Path. **14**, 509 (1951).

Shibata, K., A. A. Benson and M. Calvin: Absorption Spectra of Suspensions of living Microorganisms. Biochem. biophys. Acta **15**, 461 (1954); ref. in Chem. Abstr. **49**, 5564e (1955).

Slepecky, R. A.: Discussion on "Multiple Functions of Dipicolinic Acid". In: Spores II, p. 171. Minneapolis 1961.

Slepecky, R., and J. W. Foster: Alterations in Metal Content of Spores of Bacillus megaterium and the Effects on some Spores Properties. J. Bact. **78**, 117 (1959).

Suzuki, K., and K. Yamasaki: Stabilities of Dipicolinic Acid Complexes with Bivalent Metals. Naturwissenschaften **44**, 396 (1957).

Storck, R., and J. T. Wachsmann: Enzyme Localization in Bacillus megaterium. J. Bact. **73**, 784 (1957).

Tanner, H. A.: Chem. Eng. News **38**, 42 (1960); ref. in Angew. Chem. **72**, 791 (1960).

Taylor, E. S.: Concentration of Free Amino Acids in the Internal Environment of Various Bacteria and Yeasts. J. gen. Microbiol. **1**, 86 (1947).

Tinneli, R.: Étude de la Biochimie de la Sporulation chez B. megaterium, I. Ann. Inst. Pasteur **88**, 212 (1955).

Tomcsik, J., u. J. B. Baumann-Grace: Sporulation und spezifische Sporangium-Reaktion. Schweiz. Z. allg. Path. **21**, 914 (1958).

Udo, S.: Studien über die Zusammensetzung von „Natto". Bull. Agric. chem. Soc. Japan **12**, 55 (1936); ref. Chem. Zbl. **1937** I, 1579.

Warburg, O., u. W. Christian: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase. Biochem. Z. **310**, 400 (1941).

Winkle, S.: Mikrobiologische und Serologische Diagnostik, S. 288. Stuttgart: G. Fischer 1955

Woese, C., and H. J. Morowitz: Kinetics of the Release of Dipicolinic Acid from Spores of Bacillus subtilis. J. Bact. **76**, 81 (1958).

Zelitch, I., and S. Ochoa: Oxydation and Reduction of Glycolic and Glyoxylic Acids in Plants. I. Glycolic Acid Oxidase. J. biol. Chem. **201**, 707 (1953).

Doz. Dr. Dr. H. Benger,
Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität, Innsbruck, Schöpfstraße 41

Zeitschrift f. Hygiene 148, 345—353 (1962)

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Medizinischen Akademie Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. med. W. Kikuth)

Versuch einer Analyse der Antigene b und h der pyogenen Staphylokokken*

Von
Ludwig Grün

(Eingegangen am 21. Dezember 1961)

Für die Aufdeckung epidemiologischer Zusammenhänge von Staphylokokkeninfektionen ist eine genaue Charakterisierung der Erregerstämme ebenso notwendig, wie es geradezu eine Voraussetzung ist, die Antigenstruktur der Keime für antibakterielle Immunitätsstudien zu kennen.

Nach den wenig erfolgreichen Versuchen einer serologischen Differenzierung der Staphylokokken von Julianelle (1922), Hegemann (1937) u. a. wurde die Prüfung der Antigenstruktur pyogener Staphylokokken 1939 von Cowan wieder aufgenommen. Er benutzte hitzegetötete Staphylokokken zur Immunisierung, und die Agglutination der zu prüfenden Stämme wurde dann auf dem Objektträger mit nichtabsorbierten Seren durchgeführt. Auf diesem Wege konnte er drei Typen erfassen; allerdings ließ sich ein Drittel der Stämme nicht klassifizieren. Einen entscheidenden Schritt kam die serologische Differenzierung der Staphylokokken dann weiter durch die Feststellung von Anderson u. Heilesen (1951), daß die Staphylokokken sowohl über thermolabile als auch über thermostabile Antigene verfügen. Ein alle Antikörper enthaltendes Immunserum kann demnach nur dann gewonnen werden, wenn die zur Immunisierung verwandten Stämme so schonend abgetötet werden, daß sowohl die thermostabilen als auch die hitzeempfindlichen thermolabilen Antigene erhalten bleiben. Aufbauend auf diesen Vorarbeiten immunisierte Oeding (1952) seine Kaninchen zur Gewinnung von Serum mit formalingetöteten Bakterien. Durch Absorption der Immunseren gelang es Oeding (1953, 1954), zehn Antigene bei pyogenen Staphylokokken nachzuweisen, die mit den kleinen lateinischen Buchstaben a bis k belegt wurden. Die Antigene a, b und c sollten sowohl in thermolabiler als auch in thermostabiler Form, die Antigene e und f nur in thermolabiler und h, i und k nur in thermostabiler Form vorliegen. Das Antigen d ist allen Staphylokokken gemeinsam und scheidet deshalb für eine Differenzierung der Keime aus.

* Herrn Prof. Dr. med. Walter Kikuth zum 65. Geburtstag gewidmet.

Das mit dem Buchstaben g belegte Antigen ist nur schwach ausgeprägt und eignet sich nur wenig zu diagnostischen Zwecken. Diesem Antigenspektrum fügte Grün (1958) das Antigen l zu, welches sowohl in thermolabiler als auch in thermostabiler Form vorkommen kann.

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden für die Agglutination der zu prüfenden Stämme 24stündige, bei 37° C gewachsene Kulturen in nativem Zustand verwendet bzw. nachdem sie 2 Std bei 120° C autoklaviert worden waren. Die Antigene waren jedoch bei den nativen 24stündigen Bakterien nicht selten durch einen noch unbekannten Faktor blockiert. Der blockierende Faktor konnte zwar durch Autoklavieren zerstört werden, aber diese Methode führte auch gleichzeitig zu einer Vernichtung der thermolabilen Antigene. Es war deshalb ein wesentlicher Fortschritt, als Oeding (1957), Grün u. Kühn (1958) nachweisen konnten, daß die blockierten Antigene in jungen, 5 Std bei 40° C gewachsenen Bakterien noch frei sind. Grün berichtete 1959, daß junge, bei 40° C gewachsene Kulturen antigenreicher waren, als es die bisher gepflegte Methode der Prüfung 24stündiger Kulturen erwarten ließ. Unter Verwendung der neuen Technik stellten dann Haukenes u. Oeding (1960) fest, daß das Faktorenserum e nicht nur Antikörper gegen e, sondern auch noch Antikörper gegen zwei bisher nicht bekannte Antigene enthielt. Diese Faktoren, die beide thermolabil sind, wurden von Haukenes u. Oeding mit m und n bezeichnet. Durch weitere serologische Untersuchungen pyogener Staphylokokken bereicherte dann Grün (1961) das Antigenspektrum um den thermolabilen Faktor o und den thermostabilen Faktor p.

Die Kenntnis der genauen Antigenstruktur eines Staphylokokkenstammes ist aber, wie in klassischer Form die Salmonellendiagnostik zeigt, geradezu das notwendige Rüstzeug des Epidemiologen. Sie ermöglicht es ihm, das Infektionsgeschehen z. B. in einer Klinik und die Verbreitungswege der Krankheitserreger zu erfassen. Um einen weiteren Einblick in die Antigenstruktur der pyogenen Staphylokokken zu gewinnen, will sich diese Arbeit mit einer Analyse jener Faktoren beschäftigen, die bisher mit den Faktorenseren b und h erfaßt wurden.

Methodik

Zur Immunisierung der Kaninchen wurde eine Vaccine des Staphylokokkenstammes 2095 mit einer Keimdichte von 4—5 Milliarden/ml hergestellt. Die Keimabtötung erfolgte durch Zugabe von 0,2 ml einer 35%igen Formalinlösung zu 10 ml Vaccine. Die mit Formalin versetzte Vaccine wurde für 2 Std bei 37° C gehalten, dann erfolgte zur Entfernung des Desinfiziens eine drei- bis viermalige Waschung mit physiologischer NaCl-Lösung. Nach der Prüfung der Sterilität wurde die Antikörperbildung der Kaninchen durch Injektion von 0,1, 0,2 und 0,4 ml Vaccine an drei aufeinanderfolgenden Tagen angeregt. Nach einer Pause von 5 Tagen wurden erneut drei Injektionen von 0,4, 0,6 und 0,8 ml Vaccine verabreicht und nach einer weiteren Pause von 5 Tagen nochmals 0,8, 1,0 und 1,0 ml Keimaufschwemmung

injiziert. Das 4 Tage nach der letzten Injektion gewonnene Immunserum agglutinierte den Vaccinestamm bis zu einem Titer von 1:10000.

Das Immunserum wurde vor der Absorption 1:10 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt.

Zur Absorption wurde entsprechend dem Vorschlag von Haukenes u. Oeding der Staphylokokkenstamm 2253 verwendet.

Ergebnis

Unter Benutzung fünfstündiger, bei 40° C gewachsener Kulturen wies der Vaccinestamm 2095 folgende Antigene auf:

a c b h i l o p.

Bei dem zur Absorption verwendeten Stamm 2253 konnten unter gleichen Prüfbedingungen folgende Antigene nachgewiesen werden:

a c e f i k l o p.

Bei der Absorption des Immunserums mit dem Stamm 2253 müssen also nicht nur, wie erwartet, Antikörper gegen den Faktor b, sondern auch gegen den Faktor h übrigbleiben. Dieser Befund war insofern überraschend, als Oeding (1952) ein h-Antigen für den Immunisierungsstamm nicht angibt. Der Unterschied in der von Oeding und mir angegebenen Antigenformel des Stammes 2095 ist jedoch leicht zu erklären. Die damalige Bestimmung der Antigenstruktur durch Oeding erfolgte an 24stündigen Kulturen, die jetzige an fünfstündigen, bei 40° C gewachsenen Keimen. Es wurde auch bereits darauf hingewiesen, daß bei Verwendung junger Kulturen die Antigenausbeute reichhaltiger ist (Grün 1959). Eine weitere Ursache für eine reichere Antigenausbeute als sie Oeding erhalten hat, ist auch noch darin zu suchen, daß ich das Ergebnis der Agglutination erst nach einem Aufenthalt des Bakterien-Serumgemisches von 2 Std bei 37° C in der feuchten Kammer ablese, während Oeding die Ergebnisse bereits wenige Minuten nach Verreiben der Bakterien in das Immunserum beurteilt. Die Agglutination ist aber bei Staphylokokken, wie schon Pröscher (1903) nachwies, erst nach 2 Std abgeschlossen. Schwache Antigene können sich bei der Sofortablesung dem Nachweis entziehen (Grün 1957, 1959). Trotzdem in dem Faktorenserum noch Antikörper gegen b und h vorhanden sein müssen, wird das Serum weiterhin als b-Serum nach Oeding bezeichnet.

Da das Antigen b sowohl thermolabil als auch -stabil, der Faktor h nur thermostabil sein soll, wurde in einem zweiten Absorptionsschritt das aus dem ersten Versuch gewonnene b-Serum solange mit autoklavierten Bakterien des Immunisierungsstammes 2095 versetzt, bis die Agglutination ausblieb.

Der Staphylokokkenstamm 2095 wies nach zweistündigem Autoklavieren bei 120° C noch folgende Antigene auf:

a c b h p.

Nach abgeschlossener zweiter Absorption mußte das b-Serum also entweder negativ für den nativen Staphylokokkenstamm 2095 sein oder durfte noch nur Antikörper gegen ein thermolabiles Antigen b enthalten. Dieses Serum wird im folgenden als b_1 bezeichnet.

Zur Prüfung der Frage, ob noch Antikörper in dem zweimal absorbierten b_1-Serum vorhanden waren, wurden zahlreiche Laborstämme sowohl nach fünfstündigem Wachstum bei 40° C, nach 24stündigem Wachstum bei 37° C als auch nach Autoklavieren von 2 Std bei 120° C untersucht. Als Beispiel für die erhobenen Befunde werden hier die Reaktionsbilder von sechs Stämmen aufgeführt.

Tabelle 1. *Staphylokokken-Agglutination im Faktorenserum*

Staph.-Stamm	b nach OEDING			b_1			phys. NaCl-Lösung		
	Immunserum 2095 absorbiert mit 2253 nativ			Immunserum 2095 absorbiert mit 2253 nativ und 2095 autoklaviert					
	Kultur			Kultur			Kultur		
	5 Std 40° C	24 Std 37° C	autokl.	5 Std 40° C	24 Std 37° C	autokl.	5 Std 40° C	24 Std 37° C	autokl.
17 A	+++	+++	+++	–	–	–	–	–	
D 86	+++	+++	+++	–	–	–	–	–	
2095	+++	+++	+++	+++	+++	–		–	
3647	+++	+++	+++	+++	+++			–	
3189	+++	+++	–	+++	+++	–	–	–	–
D 124	+++	–	+++					–	

+++ = starke Agglutination; — = keine Agglutination.

Der Stamm 17 A zeigte in drei Untersuchungsreihen im b-Serum eine starke Agglutination. Diese Reaktion fehlte in dem doppelt absorbierten Serum b_1. Der Stamm D 86 zeigte eine dem Stamm 17 A identische Reaktion. Anders verhielt sich der Teststamm 2095. Die nativen Keime wurden sowohl als fünfstündige als auch als 24stündige Kulturen agglutiniert. Wie zu erwarten, waren die autoklavierten Bakterien im b-Serum positiv, im b_1-Stamm jedoch negativ. Gleichsinnig verhielt sich der Stamm 3647. Ein anderes Reaktionsbild konnte wiederum bei der Kultur 3189 beobachtet werden. Die nativen Bakterien wurden in den beiden Seren b und b_1 stark agglutiniert. Diese Reaktion unterblieb bei den autoklavierten Keimen. Der Stamm D 124 zeigte eine seit langem bekannte Eigenschaft. Starke Agglutination in dem b-Serum bei Verwendung fünfstündiger Kulturen; bei Benutzung 24stündiger Keime ist der Antigennachweis blockiert und gelingt wieder nach einem Autoklavieren der Keime. In dem b_1-Serum unterbleibt jede Reaktion.

Aus dieser Versuchsreihe können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. In dem zweifach absorbierten Serum sind keine Antikörper gegen thermostabile Faktoren mehr vorhanden. In diesem Serum sind jedoch

noch Antikörper gegen thermolabile Antigene der pyogenen Staphylokokken gegenwärtig. Dieser thermolabile Faktor liegt z. B. beim Stamm 3189 in reiner Form vor, da sowohl die fünf- als auch die 24stündigen nativen Bakterien im b-Serum und im b_1-Serum agglutiniert werden. Wird der thermolabile Faktor durch Autoklavieren zerstört, so unterbleibt die Agglutination.

2. Die Stämme 17 A, D 86 und D 124 weisen lediglich einen thermostabilen Faktor auf. In einem b_1-Serum, aus dem die gegen den thermostabilen Faktor gerichteten Antikörper entfernt wurden, tritt keine Reaktion mehr auf.

3. Das thermostabile und das thermolabile Antigen können gleichzeitig bei einem Staphylokokkenstamm vorhanden sein, wie das Beispiel der Kulturen 2095 und 3647 zeigt. Da der Stamm 2095 zur Gewinnung des Faktorenserums b nach Oeding zur Immunisierung benutzt wird, mußten in diesem Stamm folglich auch Antikörper gegen beide Faktoren — den thermolabilen und den -stabilen — vorhanden sein. Diese beiden Antigene sind weder identisch noch aneinandergekoppelt, wie aus den Beispielen zu ersehen ist. Es sind vielmehr unabhängige Antigene, die auch verschieden bezeichnet werden sollten.

Da es schon der Übersicht wegen zweckmäßig sein dürfte, aus der Bezeichnung der Antigene zu erkennen, ob diese thermostabil oder thermolabil sind, möchte ich vorschlagen, in Zukunft die hitzestabilen Antigene mit großen Buchstaben, die hitzelabilen mit kleinen Buchstaben zu belegen. Im vorliegenden Falle müßte also dann der mit dem Serum b_1 nachgewiesene Faktor mit b, das thermostabile Antigen mit BH bezeichnet werden. Folglich wird das nach Oeding hergestellte b-Serum ein BbH-Serum, das hier als b_1-Serum bezeichnete ein b-Serum.

Alle bisherigen Untersuchungen gingen von der Vorstellung aus, daß mit einem absorbierten Serum jeweils nur ein Antigen nachgewiesen würde. Doch bereits die ersten Untersuchungen zeigten, daß in dem nach Oeding hergestellten b-Serum Antikörper gegen BH und b vorhanden waren. Zur Klärung der Frage, ob es über die Herstellung eines h-Serums möglich sei, zu entscheiden, ob B und H verschiedene oder gleiche Antikörper sind, wurde nach dem Schema von Oeding ein h-Serum hergestellt. Zur Immunisierung wurde der Staphylokokkenstamm 17 A benutzt. Dieser zeigte folgende Antigenformel:

ac B f H k o.

Die Gewinnung des Immunserums erfolgte in der schon beschriebenen Weise. Zur Absorption wurde der Stamm 1503 mit der Antigenformel

ac e f i k l o

verwendet. Schon aus der Übersicht der Antigene ging hervor, daß eine Trennung von B und H auf diesem Wege nicht möglich war. Es

verbleiben nach erfolgter Absorption im h-Serum noch Antikörper gegen B und H. Zum Unterschied vom alten b-Serum nach Oeding, dem vorher als BbH-Serum bezeichneten, enthält das h-Serum jedoch nur Antikörper gegen B und H, weil der zur Immunisierung verwendete Stamm nur die thermostabilen Antigene BH besitzt. Es fehlen im h-Serum also Antikörper gegen das thermolabile b. Es müssen deshalb alle Stämme, die nur über die thermostabilen Antigene B und H verfügen, in beiden Faktorenseren agglutiniert werden. Lediglich jene Stämme, die nur über ein thermolabiles b verfügen, dürfen nur im alten b-Serum (dem jetzigen BbH-Serum) und im b-Serum agglutiniert werden, nicht jedoch im absorbierten 17 A-Immunserum. Um die Richtigkeit dieser Überlegungen zu prüfen, wurden jene Stämme unserer Sammlung entnommen, die lediglich im alten b-Serum, nicht aber im h-Serum nach Oeding agglutinierten. Diese Stämme wurden dann in folgende Faktorenseren verrieben:

1. BbH-Serum,
2. b-Serum,
3. h-Serum nach Oeding,
4. in ein BbH-Serum, welches zusätzlich mit dem Stamm 3189 absorbiert wurde. Dieser Absorptionsstamm besitzt nur ein b, so daß aus dem BbH-Serum die Antikörper gegen b eliminiert wurden. Die Tab. 2 zeigt hierzu zwei Beispiele.

Tabelle 2. *Staphylokokken-Agglutination im Faktorenserum*

Staph.-Stamm	BbH	b_1-Serum	h-Serum n. Oeding	BH-Serum
	Immunserum 2095 abs. mit 2253 nativ	Immunserum 2095 abs. mit 2253 nativ und 2095 autokl.	Immunserum 17 A abs. mit 1503 nativ	Immunserum 2095 abs. mit 2253 nativ und 3189 nativ
D 115 nativ	++	++	–	–
autokl.	–	–	–	–
D 116 nativ	++	++	–	–
autokl.	–	–	–	–

++ = deutliche Agglutination; – = keine Agglutination.

Die Reaktionsbilder fielen erwartungsgemäß aus, da das BbH-Serum ebenso wie das b-Serum Antikörper gegen den thermolabilen Faktor enthält. In beiden Seren war eine deutliche Reaktion zu beobachten. In dem h-Serum nach Oeding blieb die Agglutination ebenso aus wie in dem von thermolabilen Antikörpern befreiten BH-Serum. Aus dieser Versuchsreihe kann nun der Schluß gezogen werden, daß in dem nach Oeding gewonnenen Faktorenserum h das thermolabile b nicht enthalten ist.

Durch kreuzweise Absorption konnte jedoch nachgewiesen werden, daß das Immunserum des Stammes 17 A nach erfolgter Absättigung mit dem Stamm 1503 und mit autoklavierten Keimen des Immunisierungsstammes 17 A noch Antikörper gegen einen thermolabilen, bisher unbekannten Faktor enthält. Das Ergebnis wird in Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 3. *Staphylokokken-Agglutination im Faktorenserum*

Staph.-Stamm	BHh	h	phys. NaCl-Lösung
	Immunserum 17 A abs. mit 1503 nativ	Immunserum 17 A abs. mit 1503 nativ und 17 A autokl.	
17 A nativ	+++	+++	–
autokl.	+++	–	–
2095 nativ	+++	–	–
autokl.	+++	–	–

+++ = starke Agglutination; – = keine Agglutination.

Es zeigt sich also, daß das Immunserum 17 A nach erfolgter Absorption mit nativen Bakterien des Stammes 1503 und autoklavierten des Stammes 17 A keine Antikörper gegen die nativen und autoklavierten Staphylokokkenstämme 1503 und 2095 mehr hatte. Negativ war auch, wie durch die Absättigung zu erwarten, die Agglutination mit autoklavierten Bakterien des Stammes 17 A. Überraschend war jedoch die Reaktion mit den nativen Keimen, die von dem Serum stark agglutiniert wurden. Der hier durch die Agglutination erfaßte Faktor ist bisher unbekannt und kann auch nicht, wie das Beispiel des Stammes 2095 zeigt, mit dem schon beschriebenen b identisch sein. Da es sich hier um ein thermolabiles Antigen handelt, wäre es mit dem Buchstaben h zu bezeichnen.

Diskussion

Haukenes u. Oeding zeigten durch ihre Versuche, daß das bisherige e-Faktorenserum nicht nur ein Antigen, sondern eine Gruppe von verschiedenen Antigenen erfaßte. Diese Beobachtung fand durch die hier vorgelegten Versuche auch für die von Oeding als b und h bezeichneten Faktorenseren ihre Bestätigung. Das bisher als b-Faktorenserum bezeichnete Serum enthält Antikörper gegen wenigstens zwei Antigene, und zwar gegen ein thermostabiles Antigen BH und gegen ein thermolabiles b. Beide Antigene sind nicht miteinander gekoppelt, denn sie können sowohl getrennt als auch gemeinsam in pyogenen Staphylokokken vorkommen. Eine gleichartige Beobachtung wurde mit dem h-Serum gemacht. Auch dieses enthält Antikörper sowohl gegen einen thermolabilen Faktor, der hier mit h bezeichnet wurde, als auch gegen ein

thermostabiles Antigen BH. Auch diese beiden Antigene sind nicht aneinander gekoppelt. Während die beiden gefundenen thermolabilen Faktoren b und h nicht identisch sind, ist eine gleiche Aussage für die thermostabilen Antigene BH, die mit Hilfe des b- und h-Serum nach Oeding nachgewiesen wurden, nicht möglich. Die bisherigen Untersuchungen lassen eher vermuten, daß die Antikörper gegen den Faktor BH identisch sind, ohne daß jedoch der letzte schlüssige Beweis erbracht werden kann. Zum Nachweis der beiden hier beschriebenen thermolabilen Antigene wird folgendes Absorptionsschema vorgeschlagen:

Faktorenserum b = Immunserum 2095 absorbiert mit 2253 nativ und 2095 autoklaviert.

Faktorenserum h = Immunserum 17 A absorbiert mit 1503 nativ und 17 A autoklaviert.

Unter der Voraussetzung, daß die bisher mit den Faktorenseren b bzw. h erfaßten thermostabilen Antigene identisch sind, kann folgender Weg zur Herstellung eines absorbierten BH-Serum beschritten werden:

Faktorenserum BH = Immunserum 2095 absorbiert mit nativem 2253 und 3189.

Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die antigene Struktur der Staphylokokken weiter aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, daß die Faktorenseren b und h nach Oeding Antikörper gegen ein wahrscheinlich identisches thermostabiles Antigen, hier als BH bezeichnet, anzeigen. In jedem der beiden Faktorenseren waren außerdem noch Antikörper gegen je ein thermolabiles Antigen enthalten, welches mit b und h gekennzeichnet wurde. Die Antigene b und h sind nicht identisch. Die Gewinnung der Faktorenseren wird beschrieben.

Literatur

Andersen, E. K., and B. Heilesen: On the occurence and typing of staphylococcus pyogenes in weeping eczema. Acta Derm. venereol. (Stockh.) **31**, 679 (1951).

Cowan, S. T.: Classification of staphylococci by slide agglutination. J. Path. Bact. **48**, 169 (1939).

Grün, L.: Über ein neues Staphylokokken-Antigen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **145**, 159 (1958).

Grün, L.: Die serologische Differenzierung von Staphylokokken. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **146**, 129 (1959).

Grün, L.: Über neue Staphylokokken-Antigene. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **181**, 210 (1961).

Grün, L., u. H. Kühn: Erfahrungen und Ergebnisse bei der serologischen Untersuchung von Staphylococcus pyogenes aureus. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **144**, 535 (1958).

Haukenes, G., and P. Oeding: On two new antigens in staphylococcus aureus. Acta path. microbiol. scand. **49**, 237 (1960).

Hegemann, G.: Untersuchungen über Typendifferenzierung der Staphylokokken. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **140**, 108 (1937).

Juliannelle, L. A.: Studies of hemolytic staphylococci: hemolytic activity-biochemical reactions-serological reactions. J. infect. Dis. **31**, 256 (1922).

Oeding, P.: Serological typing of staphylococci. Acta path. microbiol. scand. Suppl. **93**, 356 (1952).

Oeding, P.: Serological typing of staphylococci II. Investigations of the serological, chemical and physical properties of the antigens. Acta path. microbiol. scand. **33**, 312 (1953).

Oeding, P.: Staphylococcal studies in hospital staffs. IV. Serological investigation. Acta path. microbiol. scand. **34**, 34 (1954).

Oeding, P.: Agglutinability of pyogenic staphylococci at various conditions. Acta path. microbiol. scand. **41**, 310 (1957).

Pröscher: Über die künstliche Immunität gegen Staphylokokken. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **34**, 437 (1903).

Professor Dr. L. Grün,
Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Medizinischen Akademie,
4 Düsseldorf, Witzelstraße 109

Zeitschrift f. Hygiene 148, 354—367 (1962)

Aus der Kölner Universitäts-Kinderklinik
(Direktor: Prof. Dr. C. Bennholdt-Thomsen)

Über die Freisetzung von bakterienfördernden Substanzen aus receptorhaltigen Materialien des Körpers durch Influenza-A-Virus

Ein Beitrag zum Virus-Bakterien-Synergismus

Von
H. Stickl

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Dezember 1961)

Die Begünstigung bakterieller Infektionen durch zahlreiche Viruserkrankungen ist eine häufige klinische Erfahrung, deren Klärung auch Ziel experimenteller Untersuchungen war[25]. Die Ursachen, die zu einer — oft fatalen — Steigerung der krankmachenden Eigenschaften der einzelnen Komponenten der Infektion („Virus-Bakterien-Synergismus") führen, ließen sich bisher nur zum Teil aufklären[25,30], und so ist die Frage — das Thema der vorliegenden Untersuchung —, wie sich ein obligat intracellulärer Schmarotzer und die extracellulär lebenden Bakterien gegenseitig und in ihrer Wirkung auf den Wirt beeinflussen können, von grundsätzlichem und von praktischem Interesse.

Die im einzelnen oft nur schwer zu definierenden Verhältnisse im Kräftespiel zwischen Organismus und Erregern erlauben nur, einzelne Vorgänge zu untersuchen und zu beschreiben. Die folgenden Untersuchungen beschränken sich daher auf die unmittelbaren Einflüsse des Influenza-Virus auf lokale und allgemeine Faktoren, soweit sie für eine hinzukommende bakterielle Infektion von Bedeutung sind.

Zahlreiche Körpersubstanzen mesenchymalen Ursprungs, wie z.B. Serum und Orosomucoid, Frauenmilch und Fetuin, die alle neuraminsäurehaltige Mucoide enthalten, hemmen durch einen relativ hitzestabilen Faktor die Vermehrung von Bakterien. Influenza-Virus bzw. seine an die Viruspartikel gebundene Neuraminidase zerstört die bakterienhemmende Wirkung dieser Substanzen; hierbei wird Neuraminsäure abgespalten, und es geht die Hemmwirkung auf die Virushämagglutination, die Eigenschaft dieser Substanzen als Virus-Inhibitoren (bzw. Receptoren für Mucoviren), verloren. Dieser Effekt des Virus läßt sich durch die von den Cholera-Vibrionen produzierte Neuraminidase, ein Lyoenzym, nachahmen[2,27]. Auch Zellen[24] und Organe[26,30] werden nach Abspaltung der Neuraminsäure aus ihrer Oberflächenstruktur durch das Influenza-Virus vermehrt anfällig gegenüber der schädigenden Wirkung bakterieller Substanzen („Toxinsynergismus"; [24–26]).

Neben der Abspaltung der Neuraminsäure durch Influenza-Virus aus neuraminsäurehaltigen Mucoproteiden werden auch andere niedermolekulare Spalt- und Reaktionsprodukte freigesetzt, dies besonders aus Zellmaterial. Diese Spaltprodukte verfügen über eine pyrogene und entzündungserregende Wirksamkeit[28,29] und scheinen selbst das Keimwachstum stimulieren zu können (vgl. Abb. 3). Inwieweit diese Spalt- und Reaktionsprodukte als ein zusätzlicher, das Bakterienwachstum fördernder Faktor anzusehen sind, soll im folgenden untersucht werden.

Material und Methoden

Virus. Influenza-A-Virus (PR 8) wurde aus der Allantoisflüssigkeit infizierter, embryonierter Hühnereier gewonnen und durch zweimalige Zentrifugation in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und gereinigt. Titerbestimmungen des Virus durch Hämagglutination (HA) von Hühnererythrocyten nach Salk[19]. Als Ausgangsmaterial für alle Versuche diente eine Virussuspension mit einem H.A.-Titer von 1:1024 (= 2^{-10}). Indicatorvirus[5,6]: durch Erhitzen auf 56° C verliert das Influenza-Virus seine Infektiosität, seine Fähigkeit, von Hühnererythrocyten zu eluieren, und seine Fermentaktivität. Hitzeinaktiviertes Virus wurde durch 30minütiges Erhitzen auf 70° C gewonnen; die H.A. war danach negativ.

Receptorabbauendes Enzym („RDE"), ein von Choleravibrionen produziertes Ferment[7], wurde durch Adsorption an menschliche Erythrocyten in Kälte, durch nachfolgende Elution und Dialyse[1] konzentriert und gereinigt. Bebrütung der Materialien mit dem so gewonnenen RDE, das eine Aktivität von 1:2000 bis 1:4000 aufwies bei 37° C über 6, 24 bzw. 36 Std (siehe Versuche) im Beisein von m/100 Ca^{++}.

Als bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) wurde eine hochgereinigte proteinfreie Substanz, gewonnen aus Salmon. abortus equi („Pyrexal", 0,5 γ LPS je Milliliter), und außerdem ein ungereinigtes, abgekochtes Kulturfiltrat von hämolysierenden E. coli verwendet. Bestimmung der Coli-Endotoxine durch Adsorption an Erythrocyten und Agglutination durch ein gegen Coli-Bakterien gerichtetes Kaninchen-Immunserum in Anlehnung an die Methode von Neter u. Mitarb.[15,16].

Die *Neuraminsäurebestimmungen* erfolgten nach Böhm u. Mitarb.[4] ohne vorherige Eiweißfällung mit der von Klenk u. Langerbeins[12] angegebenen Bialschen Farbmethode bei 570 mμ; Berechnung als Neuraminsäure-Methylglykosid (Standardsubstanz). Die Dialyse von Serum, RDE und anderem erfolgte, wenn nicht in den Versuchen anders angegeben, in Cellophanschläuchen gegen die zweimal 1000fache Menge physiologischer Kochsalzlösung mit prim./sek. Phosphatpufferzusatz (m/150) nach Sørensen bei 4° C unter ständigem Rühren.

Bakterienwachstumsteste. Agarschüttelkulturen, in denen Keime und Testsubstanzen vor Erstarren des Agars vermischt wurden, und Röhrchenteste, in denen das Keimwachstum an Hand der Trübung (+ bis + + + +) geschätzt wurde, ergaben keine hinreichend genauen Ergebnisse; beide Teste wurden daher nur in einigen orientierenden Versuchen angewandt. Eine genauere Beurteilung des Keimwachstums gestatteten Teste mit Formazanreagens, angelehnt an die Methode von Rajam u. Adcock[17] und von Ritzerfeldt[18]: Zu 2 ml Standardnährbouillon wurden 0,4 ml des Reagens eingegeben; durch das Keimwachstum wird 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu rotem Formazan reduziert. In Abwandlung der Originalmethode wird der Ansatz mit je 1 ml n-Butyl-Alkohol ausgeschüttelt und anschließend scharf abzentrifugiert (10 min, 10000 g). Die im überstehenden Butylalkohol

quantitativ extrahierte Formazanrötung wird photometrisch bei 490 mμ bestimmt. Weitere Aussagen über das Keimwachstum ergaben manometrische Untersuchungen mit dem Warburg-Apparat. Ablesung des Druckes in den insgesamt 2,2 ml fassenden erlenmeyerförmigen Reaktionsgefäßen in regelmäßigen Zeitabständen, Umrechnung der Ablesewerte an Hand der Gefäßkonstanten und unter Berücksichtigung der Werte im Thermobarographen auf mm^3 O_2-Verbrauch. Thermostateneinstellung auf 37°C.

Der Hauttest nach Menkin[13] mit Trypanblau als Indicator gibt die lokale und entzündungserregende Wirkung von subcutan bzw. intracutan injizierten Testsubstanzen an: Albinokaninchen erhielten je Kilogramm Körpergewicht 0,6 ml einer 1%igen, angewärmten Trypanblaulösung intravenös gespritzt und nach 10 min je 0,2 ml der zu testenden Lösungen intracutan in die geschorene Bauchhaut. Die Ausmessung der sich bildenden Blauhöfe erfolgte 30, 90 und 180 min nach Injektion.

Versuche*

In den Keimwachstumsversuchen mit Agarschüttelkulturen, denen Bakterien, humane Erythrocyten und Influenza-Virus bzw. in den Kontrollen die gleiche Volumenmenge physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt wurden, ergab sich bei den mit Influenza-Virus beschickten Platten ein nur angedeutet schnelleres Aufschießen der Bakterienkolonien; die geringen Unterschiede dieser Kulturen zu den Kontrollen waren innerhalb weniger Stunden verwischt.

Der *Röhrchentest* mit „Formazanreagens" als Indicator für das Keimwachstum zeigte, daß bei Zusatz einer sterilen Influenza-A-Virus-Suspension zu einer 2%igen Standard-Nährbouillon-Lösung, die eine 5%ige Suspension gewaschener Erythrocyten enthielt, das Keimwachstum (E. Coli und Staph. haemolyt. aur.) um das Doppelte stärker war als in den virusfreien Kontrollen. Bei Zusatz von Cholera-Neuraminidase (Aktivität im gesamten Ansatz 1:32) anstatt des Virus trat eine vierfach stärkere Formazanrötung ein: Das Wachstum der Bakterien war hier also noch stärker als in den virushaltigen Versuchsansätzen.

Da durch Neuraminidase, wie bereits beschrieben[28,29], von den Erythrocyten nicht nur Neuraminsäure abgespalten wird, sondern auch durch sekundär angeregte Prozesse eine Reihe von niedermolekularen Spalt- und Reaktionsprodukten freigesetzt wird, lag nahe, daß diese Substanzen das Keimwachstum zu beeinflussen vermögen.

In große Reagensgläser (20 mm ∅) werden kleine, unten mit einer Dialysenmembran verschlossene, mit einem Gummiring und mit Gummilösung seitlich abgedichtete Einsatzzylinder eingebracht (siehe Abb. 1).

Die etwa 2 ml fassenden Einsatzzylinder wurden mit einer Suspension menschlicher Erythrocyten (50%) beschickt, der Virus (0,2 ml, HA 10^{-2}), gereinigtes und dialysiertes RDE bzw. in den Kontrollen die analoge Volumenmenge (0,2 ml) Kochsalzlösung zugesetzt wurden (*R*, Abb. 1). Der Raum um die Einsatzzylinder enthielt 5 ml einer mit Bakterien

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

(E. Coli bzw. Staph. haemolyt. aur.) beimpften physiologischen Kochsalzlösung, der 0,8 ml Formazanreagens zugesetzt war. Halbstündliches vorsichtiges Schwenken in den ersten Stunden. Ablesen der Formazanrötung nach 4 und nach 24 Std. Die durch die Dialysenmembran durchtretenden *niedermolekularen Substanzen* ließen eine geringe Wachstumsverstärkung

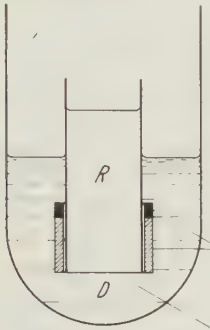


Abb. 1. Keimwachstumsversuch mit Dialyse-Einsatzzylinderchen. *R* Reaktionsraum mit den zu prüfenden Materialien; *D* Dialysat

Tabelle 1. *Der Einfluß dialysabler, niedermolekularer Substanzen, freigesetzt durch Eingabe von fermentaktivem Influenza-A-Virus, Influenza-A-Indicatorvirus oder von „RDE" in die Dialyse-Einsatzzylinder (vgl. Abb. 1) auf das Wachstum von E. Coli*

Material	Kontrolle (keine Zusätze)	Indicator-Virus	Influenza-A-Virus (PR 8)	„RDE"(Receptor destroying Enzyme)
Keimwachstum, gemessen an der Formazanrötung (+ bis ++++)	±	(+)	++	++++

(++) der sich sonst in reiner physiologischer Kochsalzlösung nicht vermehrenden Keime erkennen, wenn fermentaktives Influenza-Virus auf die Erythrocyten einwirkte. Bei Zusatz von RDE, das selbst nicht dialysabel ist, war das Keimwachstum im Dialysat am stärksten (++++), während Indicatorvirus, in einer der HA des fermentaktiven Virus entsprechenden Menge zugesetzt, keine über das Wachstum der Kontrollen hinausgehende Wirkung aufwies (± bis +), siehe Tab. 1.

Auch anderes Material, wie *Serum*, das Neuraminsäure enthält und über eine Virusinhibitor- bzw. Receptorwirksamkeit verfügt, läßt unter der Einwirkung von Influenza-Virus und seinem Enzym verstärktes Wachstum zugesetzter Bakterien erkennen (siehe Abb. 2). Gleichzeitig wurde der Einfluß der isolierten, virusfreien Reaktions- und Spaltprodukte (siehe oben) auf das Wachstum von E. Coli untersucht (Formazan-Test).

Folgende Versuchsanordnung wurde getroffen (siehe Abb.2): Zu je 1,8 ml humanem komplementinaktiviertem Serum, das mit E. coli frisch beimpft war, wurden je 0,2 ml der Zusätze A, B und C gegeben:

A: isolierte, virusfreie Zellreaktionsprodukte der Hühnerblutzellen mit Influenza-A-Virus mit einem N-Gehalt von 17 mg-%;

B: Physiologische Kochsalzlösung (Kontrolle);

C: Influenza-A-Virus PR 8 mit einem HA-Titer von 2^{-10}/ml.

Wird die gleiche Menge der isolierten, virusfreien Zellreaktionsprodukte (0,2 ml) zu 1,8 ml physiologischer Kochsalzlösung gegeben, so erfolgt keine meßbare Keimvermehrung.

Zwei Stunden nach Einstellen in den Thermostaten (37°C) Zugabe von Formazanreagens. Scharfes Abzentrifugieren der feinen roten Formazanpartikeln, Lösen des Formazans aus dem Sediment mit n-Butylalkohol.

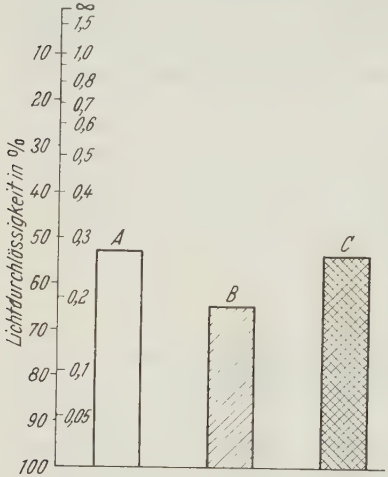


Abb. 2. Keimwachstum mit Formazan-Reagens (maxim. Wachstum bei Extinktion = ∞, λ = 490 mμ). Durch mittelbaren (*A* virusfreie Zellreaktionsprodukte) und durch unmittelbaren Einfluß (*C* Zusatz von Influenza-Virus zu Serum) von Virus-Neuraminidase auf Serumreceptoren erfolgt eine Begünstigung des Wachstums von dem Serum zugesetzten Coli-Bakterien

Werden gewaschene Erythrocyten durch Behandlung mit Cholera-Neuraminidase virusreceptorarm gemacht, anschließend durch mehrfache Zentrifugation in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, so werden nach Zusatz von fermentaktivem Influenza-A-Virus keine Spalt- und Reaktionsprodukte von den Zellen mehr freigegeben. Im Versuch mit den Dialyse-Einsatz-Zylindern (vgl. Abb. 1) treten dementsprechend keine

Tabelle 2. *Erythrocyten in Dialyse-Einsatzzylindern (siehe Abb. 1)*

Beurteilung des Keimwachstums im umgebenden Medium mit Hilfe der Formazanrötung (+ bis + + + +), Colorimetrieren durch Ausverdünnen auf Farbgleichheit. Zusatz von je 0,4 ml Formazanreagens/2 ml Medium nach 4 Std Inkubation im Brutschrank bei 37°C

Material	Keimwachstum	Hämolyse
normale, gewaschene Hühnerblutzellen in physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle)	(+)	⌀
normale, gewaschene Hühnerblutzellen + Influenza-A-Virus (PR 8) 0,2 ml von 10 H.D.	++	+
receptorarme Erythrocyten (nach Behandlung mit RDE) in physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle)	(+)	(+)
receptorarme Erythrocyten + Influenza-A-Virus (PR 8)	(+)	(+)

niedermolekularen, dialysablen Substanzen ins umgebende Medium (Dialysat) mehr über. Der Stickstoffgehalt im Dialysat betrug 2 mg-% Das Bakterienwachstum, gemessen an der Formazanrötung, erfuhr keine Steigerung (siehe Tab. 2).

Manometrische Untersuchungen

Humanes, komplementinaktiviertes Serum wurde mit m/100 $CaCl_2$ und mit Cholera-Neuraminidase(RDE) versetzt, so daß je Milliliter Serum zwei RDE-Einheiten zur Wirkung kamen. Hiervon wurde eine Probe bei 37° C gegen (*A*) physiologische Kochsalzlösung, die ebenfalls m/100 $CaCl_2$ und 150 mg-% Glucose enthält, dialysiert. Die andere Serumprobe (*B*) reagierte ebenfalls 24 Std lang bei 37° C mit RDE, jedoch *ohne* Dialyse (*B*, Abb. 3). Als Kontrolle (*C*) diente Serum, dem anstatt RDE die gleiche Volumenmenge physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt wurde. Sterilitätskontrolle der Serumproben.

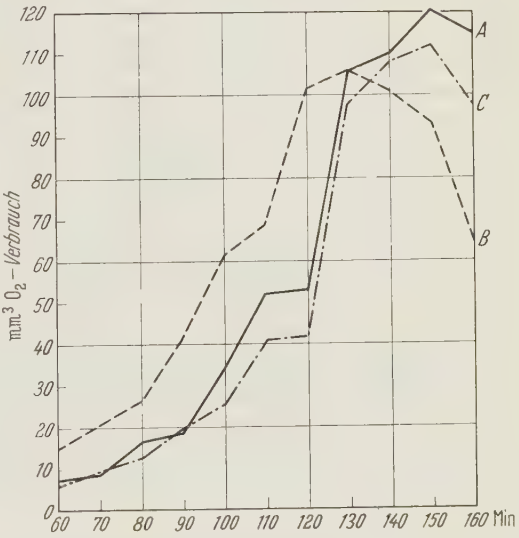


Abb. 3. Im Serum mit Neuraminidase-Einwirkung, aus dem die niedermolekularen Spaltprodukte nicht durch Dialyse entfernt wurden (*B* – –), ist die stärkste Keimvermehrung zu verzeichnen (manometrische Messungen der Bakterienatmung mit dem Warburg-Apparat). *A* ——— Serum dialysiert mit RDE, *B* – – Serum nicht dialysiert mit RDE, *C* –·– Serum nicht dialysiert ohne RDE (Kontrolle)

Gesamteiweißbestimmung (Bial) und Einstellung auf gleiche Eiweißkonzentration (Konzentrationsverschiebung durch Dialyse). Die Reaktionsgefäße des Warburg-Apparates wurden mit je 1,2 ml der Serumproben *A*, *B* oder *C* beschickt; je Gefäß wurden 0,8 ml einer frisch mit Colibakterien beimpften Standard-Nährbouillonlösung zugesetzt. Ablesung in Intervallen von 10 min (siehe Abb. 3).

In die erlenmeyerförmigen Reaktionsgefäße des Warburg-Apparates wurden gleichzeitig 1,0 ml einer Suspension (14 g-% Hgb.) humaner, selbst kaum atmender Erythrocyten, 0,8 ml einer 2%igen, mit hämolysierenden E. Coli beimpften Standard-Nährbouillonlösung und entweder 0,2 ml einer fermentaktiven Influenza-A-Virus-Suspension mit einem HA-Titer von 2^{-10} oder statt dessen (Kontrolle) 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung eingegeben.

Es kommen also Erythrocyten und Virus im Beisein rasch sich vermehrender Keime zur Reaktion (siehe Abb. 4). Die Steigerung der Keimatmung, die auf eine raschere Vermehrung der Bakterien zurückgeführt wird, setzt bei der virushaltigen Blutkörperchenaufschwemmung nach einer Latenzzeit von 100 bis 120 min ein (siehe Abb. 4).

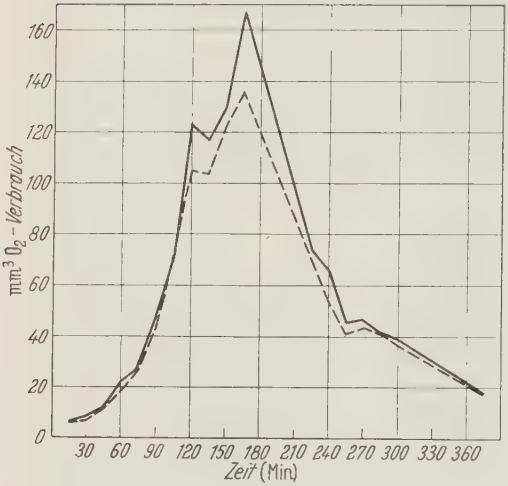


Abb. 4. Influenza-A-Virus (PR 8), einer Erythrocytensuspension zugesetzt, steigert die Atmung eingeimpfter Colibakterien, entsprechend der Vermehrung der Keime (Durchschnittswerte aus je 5 Warburg-Gefäßen: +3,1%)

Im Wiederholungsversuch mit der gleichen Versuchsanordnung, jedoch mit einer dünneren Erythrocytensuspension (5 g-% Hgb.), um Fehler durch stärkere Blutkörperchenklumpungen durch Virusagglutination zu vermeiden, ergab sich fast die gleiche Bakterienatmungskurve.

Beruht die das Keimwachstum fördernde Wirkung des Influenza-A-Virus auf der Enzymaktivität der virusgebundenen Neuraminidase und ihrem Angriff auf Virusrezeptorsubstanzen, so ist ein ähnlicher Effekt auf das Wachstum begleitender Keime auch durch die Cholera-Neuraminidase zu erwarten.

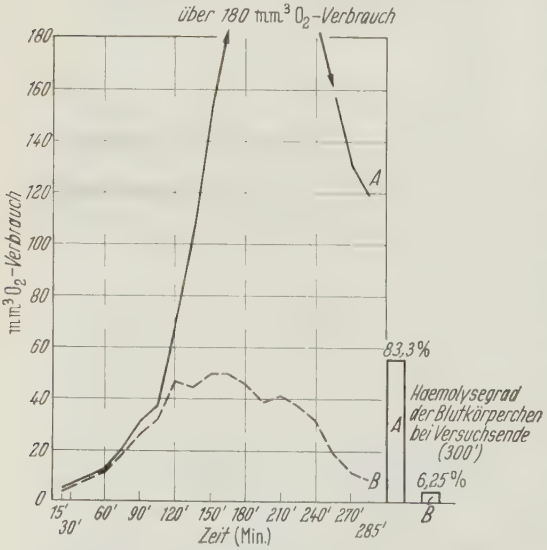


Abb. 5. Eine mit E. Coli infizierte Blutzellsuspension ergibt unter Einwirkung von Cholera-Neuraminidase („RDE": *A*) weit stärkere Keimatmung und Hämolyse als unter gleichen Bedingungen in der RDE-inaktiven Kontrolle

Durch zehnminutiges Kochen nach Zusatz von Citrat fermentinaktiviertes RDE (Kontrolle) beeinflußte die Keimatmungskurven nicht nennenswert (Zusatz des inaktiven RDE in gleichen Volumenmengen). Zusatz von RDE, so daß je Milliliter eine Aktivität von 1:12 zur Wirkung kam (im Beisein von m/1000 Ca^{++}); Einstellen der Suspension humaner Blutkörperchen auf einen Hgb.-Wert von 4 g-% (siehe Abb. 5).

Bei Beendigung des Versuches war nach 300 min unter Einfluß des RDE und der freigewordenen bakteriellen Hämolysine starke *Hämolyse* eingetreten (vgl. [24]).

Nach Abzentrifugieren intakter Erythrocyten, Bakterien und Stromata (2000 g, 30 min, nochmaliges Zentrifugieren des Überstandes bei 10000 g) enthielt der Überstand des Ansatzes *A* (mit RDE) 83,3%, der gleichermaßen behandelte Überstand der Kontrolle (Ansatz *B*) hingegen nur 6,2% des im Reaktionsgefäß des Warburg-Apparates insgesamt vorhandenen Hämoglobins (= 100%).

Um auch mit Influenza-Virus, das eine längere Reaktionszeit als RDE benötigt, eine gleich zu Anfang besser sichtbare Wirkung auf die Atmung

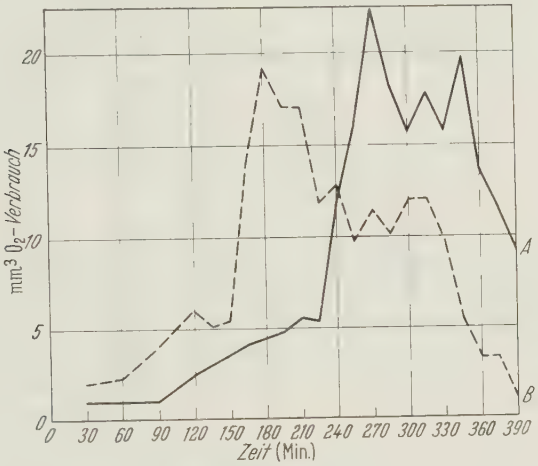


Abb. 6. Fast ohne Latenzzeit einsetzende Vermehrung von E. Coli (Keimatmungskurve *B*) nach Vorbehandlung der Erythrocytensuspension mit Influenza-Virus. Kurve *A*: Kontrolle ohne Virus, Beimpfung der Erythrocytensuspension mit hämolysierenden E. Coli

und Vermehrung von Bakterien darstellen zu können, erfolgt die Beimpfung mit Keimen erst 6 Std, nachdem Virus und Erythrocyten miteinander reagierten.

Je Warburg-Reaktionsgefäß werden 1 ml einer Erythrocytensuspension (4 g-% Hgb.), 0,2 ml fermentaktives Influenza-A-Virus PR 8 mit einem HA-Titer von 2^{10} bzw. in den Kontrollen 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung, 0,6 ml einer 2%igen Standard-Nährbouillonlösung eingegeben; in die Seitenarme der Reaktionsgefäße kommen je 0,2 ml einer in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommenen Suspension von Coli-Bakterien. Einkippen nach 6 Std (siehe Abb. 6).

Im folgenden Hauttest (nach Menkin) wird die lokale Entzündungsreizwirkung der zell- und bakterienfreien Zellreaktionsprodukte (siehe oben) mit Influenza-Virus und Hühnerblutzellen allein und nach Beimpfung mit Bakterien untersucht.

Verbrauchen die Keime nach Kontakt mit dem Virus die von den Blutzellen freigegebenen Substanzen als Wachstumsmedium, so ist zu erwarten, daß deren entzündungsaktive Wirksamkeit abnimmt. Erwartungsgemäß sollten nach Entfernung der Keime aus dem Medium diese auch entzündungswirksame, bakteriogene Substanzen abgegeben haben, so daß ein hier nicht abzutrennendes Überschneiden der virogenen und der bakteriogenen Entzündungswirkung eintritt. Immerhin wird

Tabelle 3. *Die mit dem Farbtest durch Trypanblau („Menkin-Test") gekennzeichneten Entzündungshöfe sind in mm² angegeben.*
Durchschnittswerte aus je zwei Reizstellen (Versuch mit zwei gesunden Albino-Kaninchen: ±14%). Die zu vergleichenden Versuche C und D sind umrahmt

Zeit nach Injektion der Reizflüssigkeit	A Kontrolle Erythrocytenfreier Überstand ohne Virus nach 6 Std Inkub. bei 37° C (Kontr.)	B Kontrolle Influenza-A-Vir. nach 6 Std bei 37° C	C Erythrocytenfr. Überstd., bakterienfrei, aus 6stündiger Inkubation der Zellen mit Infl. Vir.	D Erythrocytenfreier Überstand nach 6 Std Inkub. mit Infl. Vir. (1.) und nach 56 Std Bebrütung mit E. Coli (2.)
30 min	45	65	100	63
1 Std	6	72	100	48
2 Std	9	96	90	70
24 Std	6	900 mm², mit zentraler Nekrose v. 30 mm²	∅	∅

die lokale Entzündungsreizung der Zell-Virus-Reaktionsprodukte durch das Bakterienwachstum deutlich vermindert (siehe Tab. 3).

Die Wiederholung des vorangehenden Versuches im Warburg-Apparat mit *abgekochtem Virus* (5 min) ergab, daß nach 300 min selbst hier deutlich stärkere Hämolyse auftrat als in den Kontrollen ohne Virus. Die Keimatmung selbst blieb im wesentlichen unbeeinflußt. Dies veranlaßte, in gleicher Versuchsanordnung anstatt des Virus einen unspezifischen, sich an die Zellen adsorbierenden Reizstoff, ein gereinigtes, bakterielles *Lipopolysaccharid* (LPS) („Pyrexal": 0,2 γ je Reaktionsgefäß des Warburg-Apparates), einzugeben. Im Gegensatz zum denaturierten Virus war hier eine Stimulierung der Keimatmung — wohl zurückzuführen auf die Irritation der Erythrocyten und dadurch

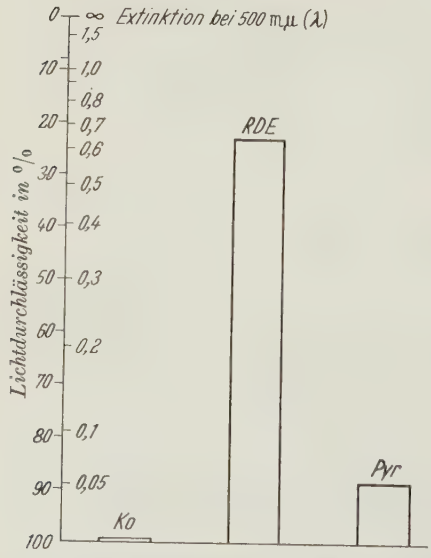


Abb. 7. Keimwachstumstest mit Formazan-Reagens (maxim. Wachstum bei Extinktion ∞). Auch durch die Adsorption eines gereinigten bakteriellen Lipopolysaccharides an die Erythrocyten (kernhaltige atmende Hühnerblutzellen) und den dadurch ausgeübten unspezifischen Reiz (*Pyr*) werden niedermolekulare keimfördernde Reaktionsprodukte freigesetzt. Wachstum von E. Coli im Dialysat der Dialyse-Einsatzzylinder (vgl. Abb. 1, *D*), gemessen an der Formazanrötung. Stärkeres Keimwachstum bei Zusatz von gereinigter Cholera-Neuraminidase (*RDE*). *Ko*: Kontrolle = in den Dialyse-Einsatzzylindern (*R*/Abb. 1) befindet sich lediglich die in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Erythrocytensuspension ohne sonstige Zusätze

freiwerdende Reaktionsprodukte — mit rasch ansteigendem und rasch abfallendem Gipfel zu verzeichnen; es kommt jedoch im Beisein des LPS nur zu geringgradiger Hämolyse, während in den LPS-freien Kontrollen durch die Stoffwechselprodukte der hämolysierenden Colibakterien eine weitaus stärkere Hämolyse eingetreten war.

Im Versuch mit Dialyse-Einsatzzylindern (siehe oben) ließ sich nachweisen, daß durch LPS-Einwirkung auf humane, gewaschene Erythrocyten dialysable niedermolekulare Substanzen freigegeben werden, die auf das Keimwachstum einen ähnlichen Einfluß ausüben wie diejenigen Substanzen, die durch Virus- oder Cholera-Neuraminidase abgespalten und von den Zellen freigesetzt wurden (siehe Abb. 7).

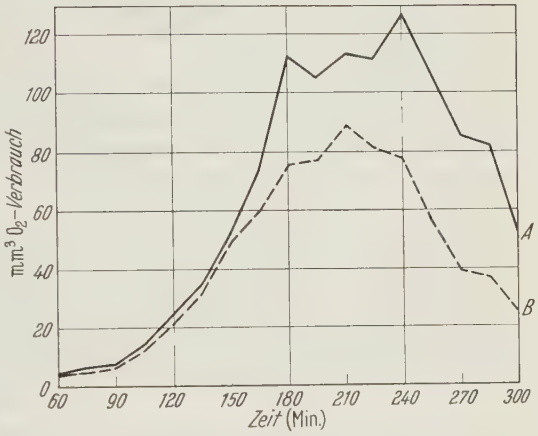


Abb. 8. Die Spalt- und Reaktionsprodukte von Blutzellen nach Reaktion mit Influenza-Virus stimulieren die Bakterienatmung (*A*). Nach Dialyse geht dieser Effekt verloren (*B*). Manometrische Messungen der Bakterienatmung mit dem Warburg-Apparat

Isolierte virusfreie Reaktionsprodukte aus dem Kontakt mit Hühnerblutzellen und Influenza-A-Virus (PR 8) wurden nicht dialysiert (Abb. 8/*A*) mit einem Gesamtstickstoffgehalt von 14 mg-% und wurden nach 18stündiger Dialyse bei 4° C (N-Gehalt: 3 mg-%, siehe Abb. 8/*B*) in den Reaktionsgefäßen des Warburg-Apparates mit hämolysierenden Colibakterien zur Reaktion gebracht (0,8 ml Reaktionsprodukte *A* oder *B* + 1,2 ml einer frisch mit E. Coli beimpften Standard-Nährbouillon). Die undialysierten Reaktionsprodukte (Abb. 8, Kurve *A*) stimulieren die Keimatmung; nach Dialyse geht dieser Effekt verloren (Kurve *B*). Wird dieser Versuch wiederholt mit Zusatz menschlicher gewaschener Blutkörperchen, so erfolgt im Beisein der undialysierten Reaktionsprodukte weitaus stärkere Hämolyse als im Beisein der dialysierten.

Dialysierte und nicht dialysierte Reaktionsprodukte ergeben nach Zusatz zu einer in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommenen Suspension von E. Coli in analoger Versuchsanordnung wie oben, aber ohne Beisein eines anderen Nährmediums oder von Erythrocyten, keine nennenswerte, sondern in beiden Versuchsansätzen gleichartig niedrige Keimatmung. Auch Konzentration der Reaktionsprodukte durch Lyophilisation auf einen N-Wert von 30 und 48 mg-% führt in gleicher Versuchsanordnung zu keinem anderen Ergebnis. Als Nährmedium scheinen

demnach die Reaktions- und Spaltprodukte in den vorliegenden Konzentrationen und Versuchen selbst nicht ausreichend zu sein.

Besprechung der Ergebnisse

Menschliches Serum und Orosomucoid, Frauenmilch und Fetuin verfügen über eine unspezifische, relativ hitzestabile Hemmwirkung auf Bakterien (Inhibine nach Dold?); diese Eigenschaft geht verloren, wenn der neuraminsäurehaltige Anteil dieser Substanzen mit Inhibitor- bzw. Receptorwirksamkeit für Myxoviren durch Virus- bzw. Cholera-Neuraminidase abgebaut wird[2,27].

Darüber hinaus werden durch die Wirksamkeit der Virus-Neuraminidase von den genannten Substanzen sowie von receptorhaltigen Zelloberflächen auch Spalt- und sekundäre Reaktionsprodukte freigesetzt, die das Wachstum hinzutretender Bakterien direkt zu stimulieren vermögen.

Bei Reaktion des Influenza-Virus mit receptorwirksamen Substanzen des Körpers ist der *Virus-Bakterien-Synergismus* demnach durch zwei Vorgänge gekennzeichnet: 1. fermentaktives Virus (Myxoviren) beseitigt die zahlreichen neuraminsäurehaltigen Körpermaterialien eigene Funktion einer Barriere gegenüber eindringenden Keimen, und 2. das Virus stimuliert mittelbar über den Weg der Freisetzung von Zellreaktionsprodukten Wachstum und Vermehrung von Bakterien.

Harnmucin, einer der wirksamsten Hemmstoffe der Virushämagglutination („Inhibitoren"), hemmt zwar selbst das Keimwachstum nicht in nennenswertem Umfange; doch werden auch hier durch enzymaktives Influenza-Virus niedermolekulare, dialysable Substanzen frei, die auf Bakterien fördernd wirken. Besonders reichlich werden diese, bzw. in gleicher Art wirkende Substanzen von Blutkörperchen — und speziell von kernhaltigen, atmenden Blutzellen (Hühnererythrocyten) — freigesetzt.

Influenza-Virus und RDE („Receptor Destroying Enzyme") können nach Inaktivierung ihrer Neuraminidasewirksamkeit durch Erhitzen diese keimfördernden Substanzen zwar aus dem Serum nicht mehr freisetzen; jedoch tritt dies in geringerem Umfange noch bei atmenden Hühnerblutzellen ein. Dies läßt auf eine unspezifische Reizwirkung des Virus und des auch nach Reinigung noch geringe Endotoxinreste enthaltenden RDE schließen. Und tatsächlich verfügt auch ein hochgereinigtes, bakterielles Endotoxin in geringster Konzentration bei Blutzellen über den gleichen, mittelbar über Freisetzung dieser niedermolekularen Substanzen gehenden, keimstimulierenden Effekt. Das bakterielle Endotoxin schützt allerdings die Zellen vor den Hämolysinen der Coli-Bakterien, während Virus- und Cholera-Neuraminidase („RDE") sie erhöht anfällig machen (siehe auch [24]).

Die niedermolekularen, keimfördernden Substanzen („Spalt- und Reaktionsprodukte"), die von virusreceptorhaltigen Zellen frei werden, entstehen somit nicht allein durch fermentative Abspaltung der neuraminsäurehaltigen Receptorsubstanzen für Myxoviren, sondern sie sind auch

als Antwort auf einen unspezifischen Zellreiz anzusehen (vgl. [14,20,21,23,28]). Sie sind auch wirksam als Pyrogene und als Substanzen mit lokaler Entzündungswirksamkeit[28,-30].

Als Nährsubstrat für Bakterien reichen sie in den vorliegenden Versuchen und Konzentrationen quantitativ offenbar selbst nicht immer aus, doch fördern sie in auffallend niedrigen Konzentrationen das Wachstum der Keime in anderen, geeigneten Medien; sie fördern ferner den Aufschluß von Zellmaterial im Beisein von Bakterien in einer für sie verwertbaren Form. Diese auf Bakterien und Zellen sich erstreckende Wirksamkeit der Spalt- und Reaktionsprodukte hängt offenbar auch mit ihrer Oberflächenaktivität zusammen[3,19,10,22]. Die durch Virusenzym abgespaltene und gereinigt dargestellte Neuraminsäure erwies sich allein gegenüber Zellen wie Bakterien als biologisch unwirksam. Bei den biologisch aktiven Spalt- und Reaktionsprodukten handelt es sich überwiegend um ein Gemisch aus Aminosäuren, Peptiden und Polypeptiden[11,28,29].

Inwieweit die Vermehrung des Virus unter den gegebenen Versuchsbedingungen durch die Spalt- und Reaktionsprodukte selbst beeinflußt werden kann, ist aus den bisher vorliegenden Untersuchungen nicht zu entnehmen.

Zusammenfassung

Der *Virus-Bakterien-Synergismus* ist nach den berichteten und zitierten Untersuchungen und unter den obliegenden Versuchsbedingungen durch zwei Vorgänge gekennzeichnet:

1. das Influenza-Virus beseitigt eine die Bakterien hemmende, unspezifische Barriere im Serum,

2. es setzt aus Serum und von den receptorhaltigen Oberflächenstrukturen von Zellen Substanzen frei, welche die Bakterien in Wachstum und Vermehrung fördern können (E. Coli und Staph. haemolyt. aur.).

Diese die Bakterien begünstigende Wirkung des Influenza-Virus geht in erster Linie auf seine Fermentaktivität (Neuraminidase) zurück, sodann aber auch auf eine unspezifische Beeinflussung biologischer Materialien, wobei sekundär niedermolekulare Reaktionsprodukte frei werden.

Die übrigen biologischen Eigenschaften und die wahrscheinliche Natur dieser Substanzen werden besprochen.

Das Zustandekommen und die allgemeine Bedeutung der Versuche werden diskutiert.

Fräulein Elisabeth Nagel und Fräulein Sieglinde Röntgen danken wir für hervorragende technische Assistenz bei Durchführung der Versuche.

Literatur

[1] Ada, G. L., and E. L. French: Purification of the Receptor Destroying Enzyme of V. Cholerae. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. **13**, 82 (1950).

[2] Aufmkolk, H.: Untersuchungen über die keimhemmende Wirksamkeit biologischer Substanzen in ihrer Beziehung zu neuraminsäurehaltigen Virusrezeptoren. Dissertation, Köln 1961.

[3] Bechhold, H.: Die Kolloide in Biologie und Medizin, 5. Aufl. Leipzig und Dresden: Steinkopff 1929.

[4] Böhm, P., u. L. Baumeister: Über das Vorkommen neuraminsäurehaltiger Glykoproteide in Körperflüssigkeiten. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **305**, 42 (1956).

[5] Briody, B. A.: Characterisation of enzymic action of Influenza Viruses on human red cells. J. Immunol. **59**, 115 (1948).

[6] Burnet, F. M.: Mucins and Mucoids in relation to influenza virus action; destruction of "Francis inhibitor" activity in purified mucoid by virus action. Aust. J. exper. Biol. Med. Sci. **26**, 381 (1948).

[7] Burnet, F. M., J. D. Stone and J. F. McCrea: Modification of human red cells by virus action. Receptor gradient for virus action in human red cells. Brit. J. exp. Path. **27**, 228 (1946).

[8] Dold, H., u. F. Weigmann: Über die Wirkung des menschlichen Speichels auf Diphtheriebazillen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **116**, 158 (1934).

[9] Glassmann, H. N.: Surface active agents and their application in bacteriology. Bact. Rev. **12**, 105 (1948).

[10] Heffter, A.: Handbuch der exper. Pharmakologie, 1. Aufl., Bd. I u. II. Berlin: Springer 1920.

[11] Klenk, E., H. Faillard u. H. Lempfried: Über die enzymatische Wirkung von Influenza Virus. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **301**, 235 (1955).

[12] Klenk, E., u. H. Langerbeins: Über die Verteilung der Neuraminsäure im Gehirn (mit einer Mikromethode zur quantitativen Bestimmung der Substanz im Nervengewebe). Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **270**, 185 (1941).

[13] Menkin, V.: Biochemische Gesichtspunkte der Entzündung. Medizinische **1956**, 557.

[14] Menkin, V.: Newer Concepts of inflammation. Springfield: Thomas 1950.

[15] Neter, E., E. A. Gorzynski, R. M. Gino, O. Westphal and O. Lüderitz: The enterobacterial Hemagglutination Test and its Diagnostic Potentialities. Canad. J. Microbiol. **2**, 232 (1955).

[16] Neter, E., E. A. Gorcynski, O. Westphal and O. Lüderitz: Studies on hemagglutination and hemolysis by Eschericia coli antisera. J. exp. Med. **96**, 1 (1952).

[17] Rajam, P. C., and J. D. Adcock: Rapid Test for screening sensitivity of Staphylococci to antiboddies. J. clin. Path. **23**, 1168 (1953).

[18] Ritzerfeldt, O.: Untersuchungen über die Resistenzwerte von Mikroorganismen bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen. Arch. Hyg. (Berl.) **139**, 332 (1955).

[19] Salk, J. E.: A simplified procedure for titratiing hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. J. Immunol. **49**, 87 (1944).

[20] Scheiffarth, F.: Ergebnisse der Medizinischen Grundlagenforschung, Band I. Stuttgart: Thieme 1956. Der gegenwärtige Stand der Allergieforschung, S. 443—524. Antigenitätsbeweise, S. 446.

[21] Shilo, M., M. Wolman and B. Wolman: Inhibition of inflammatory response of Skin to staphylococcus aureus by high polymer levan. Brit. J. exp. Path. **37**, 219 (1956).

[22] Söhngen, N. L.: Einfluß von Kolloiden auf mikrobiologische Prozesse. Zbl. Bakt., II. Abt. **38**, 621 (1913).

[23] Spector, W. G.: Role of some higher peptides in inflammation. J. Path. Bact. **63**, 390 (1951).

[24] Stickl, H.: Über die Wirkungsbeeinflussung von Bakterientoxinen durch Virusenzym. Z. Kinderheilk. **80**, 519 (1958).

[25] Stickl, H.: Art und Zustandekommen kombinierter Wirkungen von Virus- und Bakterieninfektionen (unter besonderer Berücksichtigung der Grippe). Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. **15**, 214 (1960).

[26] Stickl, H.: Die Herzbeteiligung bei Grippe (Experimentelle Studien über die Entstehung morphologischer Veränderungen des Myocards bei Grippe). Z. Kinderheilk. **84**, 1—17 (1960).

Stickl, H.: Der Synergismus von Bakteriengift und Grippevirus. (Experimentelle und klinische Beobachtungen). Z. Kinderheilk. **84**, 77—83 (1960).

[27] Stickl, H., u. H. Aufmkolk: Neuraminsäurehaltige Körpersubstanzen in ihrer Wirkung auf das Bakterienwachstum. Klin. Wschr. **39**, 111 (1961).

Stickl, H., u. H. Aufmkolk: Neuraminsäurehaltige Körpersubstanzen in ihrer Wirkung auf das Bakterienwachstum. (Ein Beitrag über Natur und Vorkommen unspezifischer Resistenzfaktoren). Z. Kinderheilk. **85**, 583 (1961).

[28] Stickl, H., u. H. Böcker: Zellatmung und Virusenzym. Z. Kinderheilk. **81**, 141 (1958).

[29] Stickl, H., u. H. Böcker: Wirkungen des Influenza-Virus. Fieber und Entzündung. Z. Kinderheilk. **81**, 389 (1958).

[30] Stickl, H., u. B. Ehmann: Influenza-Virus und Staphylokokken im Unterhautgewebe. (Ein Beitrag zum Virus-Bakterien-Synergismus). Z. Kinderheilk. **84**, 548 (1960).

Priv.-Doz. Dr. med. H. Stickl,
Universitäts-Kinderklinik, 5 Köln-Lindenthal, Lindenburg

Zeitschrift f. Hygiene 148, 368—374 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Wien
(Suppl. Leiter: Doz. Dr. Hans Moritsch)

Infektionen durch den Actinobacillus lignieresi beim Menschen

Von
Heinz Flamm und Gerhard Wiedermann

(Eingegangen am 22. Januar 1962)

Die Actinobacillose wurde erstmals 1902 von Lignières u. Spitz in Argentinien als Tierseuche beschrieben. Sie breitete sich in den Rinderherden sehr rasch aus, erfaßte bis zu 50% der Tiere jeden Alters und blieb nach ihrem Höhepunkt nur mehr als Enzootie bestehen. Schafe wurden damals nur selten befallen. Weitere Erkrankungen von Schafen durch Actinobacillus lignieresi wurden auch von anderen Autoren beschrieben (Bothworth 1937; Marsh u. Wilkins 1939; Davis u. Stiles 1939; Wramby 1940; Taylor 1944). Pferde blieben von der Erkrankung verschont.

Bei etwa vier Fünftel der erkrankten Rinder findet man im subcutanen Gewebe besonders des Nackens multiple, der Haut anhaftende Knoten. Diese schmelzen bald ein und können gelegentlich exulcerieren, wobei sich ein geruchloser, sehr viscöser, gelblich-grüner Eiter entleert, in dem grau-weißliche Körnchen von maximal $^1/_2$ mm ○ zu sehen sind. Regelmäßig sind die regionären Lymphknoten befallen, was differentialdiagnostisch gegenüber der Actinomykose von Bedeutung ist.

Bei den enzootischen Fällen sind vielfach auch Maul, Wangen, Zunge, Gaumen und Pharynx sowie innere Organe befallen. Wenn die Zunge befallen ist, entwickelt sich das Bild der Holzzunge, wie sie auch bei der Actinomykose bekannt ist.

Die Prädilektionsstelle bei Schafen findet sich im Bereiche des Maules.

Beim Menschen wurde diese Erkrankung bisher jedoch sehr selten erkannt. In der Weltliteratur wurden fünf Fälle, darunter ein kulturell nicht verifizierter, publiziert, denen wir in den letzten Jahren zwei weitere verifizierte beifügen konnten. Die insgesamt sieben Fälle verteilen sich auf zwei Meningitiden, zwei Sepsisfälle und drei lokalisierte Infektionen (Kopf bzw. Darm).

Ravaut u. Pinoy (1911) berichteten über einen 16jährigen Argentinier, bei dem sich kurz nach einer wegen Otitis media und Mastoiditis durchgeführten Mastoidtrepanation eine Meningitis entwickelte. Die Punktion ergab einen klaren

Liquor, der neben Polymorphkernigen und großen Mononucleären vorwiegend Lymphocyten enthielt. Actinobacillus lignieresi wurde aus dem Liquor kultiviert. Der Patient genas.

Der nächste Fall wurde 1926 von Gerdine u. Pease publiziert. Ein 11 Monate alter Säugling erkrankte kurz nach der Umstellung von Mutter- auf Kuhmilch ebenfalls an einer Meningitis. Der eitrige Liquor enthielt 2210 vorwiegend polymorphkernige Leukocyten pro Milliliter und war bakterioskopisch und kulturell positiv. Das Kind erlag der Infektion.

Sechs Jahre später veröffentlichten Thompson u. Willius (1932) bzw. Lawrence, Neuhauser u. Howell (1932) einen septisch verlaufenden Fall von Actinobacillose. Ein 26jähriger Fleischhauer verletzte sich beim Zerlegen eines Rindes oberflächlich am Bauch. Nach rascher Wundheilung traten einige Tage später unregelmäßiges Fieber und Gliederschmerzen auf. Nach Aufnahme in einem Spital wurde aus vier Blutproben des Patienten Actinobacillus lignieresi kultiviert. Das Patientenserum agglutinierte den gezüchteten Stamm bis zu einer Verdünnung von 1:80, später sogar bis 1:320. Eine Kaliumjodid-Therapie hatte keinen Erfolg. Man hatte sogar den Eindruck, daß sich das klinische Bild dabei verschlechterte. Es kam zu einem Anfall von Hämoptoe und Brustschmerzen (Herxheimersche Reaktion?). Hingegen führte die folgende Behandlung mit Natriumkakodylat und zeitweise zusätzlich mit Neosalvarsan zur Ausheilung des Patienten.

Über ein ebenfalls septisches Bild dieser Erkrankung berichteten Beaver u. Thompson (1933). Ein 34jähriger Diabetiker wurde wegen einer schon seit einigen Monaten bestehenden fieberhaften Erkrankung mit allgemeiner Schwäche und Gewichtsverlust in eine Klinik eingewiesen. Das schwer verlaufende Krankheitsbild war nicht beeinflußbar. Unter pneumonischen Erscheinungen kam der Patient ad exitum. Bei der Obduktion fanden sich in Leber und Milz, in der Rinde einer Niere sowie in beiden Lungen multiple, ungleich große, graue Knötchen von derber Konsistenz. Im histologischen Schnitt hatten sie eine zentrale Nekrose, welche von einem breiten Saum aus polymorphkernigen Leukocyten mit spärlich Lymphocyten und großen phagocytierenden Mononucleären umgeben war. Peripherwärts fanden sich auch in zunehmendem Maße Fibrioblasten, Epithelzellen und Gefäßsprossen. Vor allem in den Randpartien waren Haufen gramnegativer Stäbchen feststellbar. Die Kultur einer „Variante des Actinobacillus lignieresi" gelang kurz vor dem Tod des Patienten aus dem Blut sowie postmortal aus Blut und inneren Organen.

Der fünfte Fall wurde leider kulturell nicht verifiziert. Nach dem klinischen Bild könnte es sich jedoch, wie der Verfasser (Langeron 1941) meinte, um eine lokale Form einer Actinobacillose im Bereiche des Schädels gehandelt haben. Seit 3 Jahren bestanden bei der jugendlichen Patientin Abscesse am Hals und im Gesicht, die zunächst für mykotische Efflorescenzen gehalten wurden. Auch hier kam es nach Jodbehandlung und Radiumbestrahlung eher zu einer Verschlechterung, die Knötchen breiteten sich auf einer Gesichtshälfte aus, um schließlich Schädelknochen, Kiefergelenk und Orbita zu ergreifen. Der sich entleerende viscöse Eiter enthielt zahlreiche gelblich-weiße Körnchen, die im Mikroskop keinen mycelartigen Aufbau zeigten. Über den Ausgang der Erkrankung wurde nicht berichtet.

15 Jahre später publizierten Flamm u. Jonas (1956) einen weiteren Fall von Actinobacillose bei einem sechsjährigen Mädchen. Das Mädchen wurde unter dem Bilde einer Pseudoappendicitis laparatomiert. Bei der Operation fiel im Ileocöcalwinkel eine Vermehrung und Vergrößerung der mesenterialen Lymphknoten auf. Aus einem exstirpierten Lymphknoten wurde Actinobacillus lignieresi gezüchtet. Das Patientenserum agglutinierte diesen Stamm bis zu einer Verdünnung von 1:160. Sieben Tage nach der Appendektomie und Entfernung der Drüsenpakete wurde das Kind beschwerdefrei entlassen.

Kürzlich beobachteten wir (Zehetbauer, Wiedermann u. Flamm 1962) eine akute eitrige Conjunctivitis bei einem 84jährigen Patienten, als deren Erreger Actinobacillus lignieresi diagnostiziert wurde. Besonders auffällig war der zähe, leicht gelbliche Eiter, der bis zu stecknadelkopfgroße Drusen enthielt. Das akute Bild entwickelte sich auf dem Boden einer chronischen Entzündung der Bindehaut. Die Erkrankung sprach auf eine lokale Achromycinbehandlung gut an.

Epidemiologie. Wenn auch bei den Infektionen der Tiere mit Actinobacillus lignieresi die Eintrittspforte nicht immer genau feststellbar ist, so handelt es sich doch nach der heutigen Auffassung wohl um eine exogene Infektion als Folge verschiedener Traumen (Stableforth u. Galloway 1959).

Soweit aus den Publikationen der fünf fremden Fälle von Actinobacillose beim Menschen zu entnehmen ist und aus unseren beiden eigenen Beobachtungen abgeleitet werden kann, dürfte hier das Tier als Infektionsquelle in Frage kommen. Möglicherweise handelt es sich nicht nur um direkte Übertragungen, sondern auch um Schmutz- und Schmierinfektionen.

Bei dem von Thomson u. Willius (1932) bzw. Lawrence, Neuhauser u. Howell (1932) beschriebenen Patienten ist die *direkte* Infektion vom Rind her als sicher anzunehmen. Der Patient, ein Fleischhauer, verletzte sich beim Zerlegen des Rindes an der Bauchhaut und erkrankte einige Tage später an Actinobacillose. Offenbar ist aber auch eine *indirekte* Infektion, z. B. durch Kuhmilch, möglich, wie der von Gerdine u. Pease (1926) beschriebene Fall vermuten läßt. Hier erkrankte ein Säugling kurz nach der Umstellung von Brustnahrung auf Kuhmilch. Für eine orale Aufnahme des Erregers sprach auch unser eigener erster Fall, bei dem ja die beschriebene Pseudoappendicitis mit dem Erregerbefund in den vergrößerten ileocöcalen Lymphknoten auf eine Invasion vom Darm her hinwies. Unser zweiter Patient war ein mit kleinen Versuchstieren (Meerschweinchen, Ratten) arbeitender Wissenschaftler eines anderen Institutes. Es könnte sich also dabei um eine Schmutz- und Schmierinfektion gehandelt haben.

Da trotz des relativ häufigen Befalls von Rindern und Schafen mit Actinobacillus lignieresi beim Menschen die Actinobacillose nur so selten gefunden wurde, sind offenbar zum Haften der Infektion am Menschen noch zusätzliche disponierende Momente notwendig. Solche sind allem Anschein nach Nahrungsumstellung beim Säugling (Fall von Gerdine u. Pease), vorausgehende Erkältungskrankheiten (Thompson u. Willius; Flamm u. Jonas), diabetische Stoffwechsellage (Beaver u. Thompson), Operationen (Ravaut u. Pinoy) und chronisch-entzündliche Prozesse (Zehetbauer, Wiedermann u. Flamm).

Bakteriologie. Der Actinobacillus lignieresi bildet mit Actinobacillus equuli, A. actinomycetem-comitans, A. actinoides und A. mallei das Genus Actinobacillus Brumpt. Dieses Genus wird heute der Familie Brucellaccae zugeordnet (Bergey 1957). Der Genus-Name bezieht sich, ebenso wie bei den Actinomyceten, auf die strahlenförmige Anordnung der Mikroorganismen in den Drusen des Eiters. In jungen Kulturen wächst der Keim als unbewegliches, gramnegatives, nicht alkoholsäurefestes Kurzstäbchen von 0,4 $\mu \times 1{,}5\ \mu$, dessen Pole sich häufig mit Methylenblau stärker anfärben. Polkörperchen und Sporen werden nicht gebildet. Mit zunehmendem Alter der Kulturen können längere Stäbchen gefunden werden. Die frei im Eiter liegenden Keime unterscheiden sich in ihrem Aussehen nicht von den auf Nährböden gewachsenen. In den Drusen des Eiters haben sie eine etwas abweichende Form und eine charakteristische Lagerung. Die Mitte dieser Granula bildet ein körniger Detritus, in dem stellenweise gramnegative Kurzstäbchen zu erkennen sind. Um dieses Zentrum sind wesentlich größere keulenförmige Gebilde angeordnet, welche sich ebenso wie die Kurzstäbchen gramnegativ verhalten. Damit unterscheiden sich die Drusen der Actinobacillose von denen der Actinomykose durch Aufbau und Anfärbbarkeit der Zentren, welche in den aktinomykotischen Granula aus einem grampositiven Mycel mit dazwischen liegenden Stäbchen bestehen.

Auf Nähragar mit einem Zusatz von 5% Schafblut wächst der Actinobacillus lignieresi in Form von durchscheinenden, scharfrandigen Kolonien mit glatter glänzender Oberfläche. Die Mehrzahl der Kolonien erreicht nur einen Durchmesser von etwa 0,5 mm. Zwischen diesen findet man immer einzelne 1—1,5 mm große Kolonien. Es handelt sich dabei nicht um eine Aufspaltung in verschiedene Klone, da in Subkulturen beider Koloniearten stets das gleiche Verhalten zu beobachten ist. Es besteht auch kein morphologischer Unterschied der Einzelindividuen der verschieden großen Kolonien. Wenn die Kolonien älter werden, so wird ihre Oberfläche peripherwärts fortschreitend gekörnt, und sie nehmen einen weißlich-grauen Farbton an. Das dem Nähragar zugesetzte Schafblut wird nicht hämolysiert. Charakteristischerweise bildet sich selbst nach Ausspatelung einer Keimsuspension auf einen festen Nährboden kein Bakterienrasen, sondern es wachsen nur dicht stehende kleinste Einzelkolonien mit einzelnen größeren dazwischen.

In Nährbouillon mit oder ohne Zusatz von Kohlenhydraten bildet der Keim nach zweitägiger Bebrütung bei 37°C ein den Boden des Röhrchens bedeckendes, mittels einer Platinöse abziehbares Häutchen mit knotigen Verdickungen. An einer Seite des Gefäßes bilden die Keime klümpchenförmige Kolonien bis zur Oberfläche der Nährflüssigkeit aus. Diese Klümpchen sind jedoch größer als die von Streptokokkenkulturen bekannten. Die maulbeerartigen oder ausgefransten Kolonien sind sehr zäh und lassen sich nur schwer verreiben. Nach einigen Tagen bilden sich an der Oberfläche der Bouillon kleine Flöckchen aus. Unsere beiden Stämme ließen die Nährbouillon stets ungetrübt, was mit den Angaben in Bergeys Manual (1957) übereinstimmt. Dort ist jedoch auch angegeben, daß manche Stämme von Actinobacillus lignieresi die Nährbouillon diffus trüben können. Von Topley u. Wilson (1957) sowie Stableforth u. Galloway (1959) wird jedoch ausschließlich eine Trübung der Bouillon mit Ausbildung eines Bodensatzes und Oberflächenhäutchens

beschrieben. In steriler Milch wachsen die Keime, ohne sie zur Gerinnung zu bringen, Gelatine wird nicht verflüssigt. Die übrigen biochemischen Eigenschaften sind nach den Literaturangaben und unseren eigenen Befunden in der Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle. *Biochemisches Verhalten von Actinobacillus lignieresi*

	Bergey 1957	Rolle 1958	Stableforth u. Galloway 1959	Topley u. Wilson 1957	Eigene Stämme 1956	Eigene Stämme 1962
Säuerung von						
Arabinose	−				−	−
Dextrose	+	+	+	+	+	+
Dulcit	−					−
Galaktose	+*		+		+	+
Glycerin	+*					−
Inosit	−				−	−
Inulin	−					−
Laevulose					+	+
Lactose	+*	+		+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Mannit	+	+	+	+	−	−
Melezitose					+−	
Raffinose	+*	+			+	+−
Rhamnose	−					−
Saccharose	+	+	+	+	+	+
Salicin	+*					−
Sorbit	−				−	−
Xylose		+				+
Voges-Proskauer-Reaktion						−
Spaltung von Äsculin						−
Wachstum auf Natriumcitrat						−
Bildung von H_2S	−				−	−
Bildung von Indol	+−			+−	−	−

+* = wechselnd, verzögert.

Im Tierversuch kann das Straußsche Phänomen beim männlichen Meerschweinchen gefunden werden (Topley u. Wilson 1957). Es ist

jedoch nicht für alle Stämme obligat (Bothworth 1927). Nach intraperitonealer Applikation unseres zweiten Stammes war ab dem 7. Tag eine zunehmende Verhärtung des rechten Hodens feststellbar. Die histologische Untersuchung nach Tötung des Tieres am 10. Tag zeigte im Bereich des rechten Hodens ein entzündliches Granulationsgewebe, das von Abscessen durchsetzt war. Der Nebenhoden war nicht befallen.

Therapie. Vor Einführung der Antibiotica wurden an Actinobacillose erkrankte Tiere mit Jod behandelt. Diese Therapie zeigte bei einem erkrankten Menschen (Thompson u. Willius 1932 bzw. Lawrence, Neuhauser u. Hewell 1932) keinen Erfolg.

Die Untersuchung unserer beiden Stämme im Diffusionstest ergab deren Empfindlichkeit gegen Penicillin, Streptomycin, Achromycin, Erythromycin, Chloromycetin, Polymyxin und Supronal. Tatsächlich gelang die Heilung der durch Actinobacillus lignieresi verursachten eitrigen Conjunctivitis unseres zweiten Patienten durch lokale Achromycin-Applikationen in relativ kurzer Zeit.

Zusammenfassung

Ausgehend von zwei eigenen Beobachtungen menschlicher Actinobacillose innerhalb von 6 Jahren, wird auf Erreger, Krankheitsbild, Epidemiologie und Therapie dieser Infektionskrankheit beim Menschen hingewiesen.

Literatur

Beaver, D. C., and L. Thompson: Actinobacillosis of man. Report of a fatal case. Amer. J. Path. **9**, 603 (1933).

Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 7. Aufl. Baltimore: Williams & Wilkins 1957.

Bothworth, T. J.: Actinomycosis in sheep. Vet. Rec. **7**, 844 (1927).

Davis, C. L., and G. W. Stiles: Actinobacillosis in rams. J. Amer. vet. med. Ass. **95**, 754 (1939).

Flamm, H., u. R. Jonas: Aktino-bazillose bei einem Kind. Wien. klin. Wschr. **68**, 671 (1956).

Gerdine, L., and D. Pease: Actinobacillus meningitis. Amer. J. Dis. Child. **32**, 878 (1926).

Langeron, M.: L'Actinobacillose Humaine. Ann. Parasit. hum. comp. **18**, 270 (1941).

Lignières, J., u. G. Spitz: Actinobacillose. Rev. Soc. Med. Argentina, Nr. 53, 1902, zitiert nach Lignières u. Spitz: Contribution à l'étude, à la classification et à la nomenclature des affections connues sous le nom d'actinomycose. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **35**, 294 (1904).

Marsh, H., and H. W. Wilkins: Actinobacillose in sheep. J. Amer. vet. med. Ass. **94**, 363 (1939).

Ravaut, P., et. Pinoy: Actinobacillose a forme méningée observée a Paris chez un Argentin (Premier cas chez l'homme de cette affection). Presse méd. **19**, 49 (1911).

Rolle, M.: Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre. Stuttgart: Enke 1958.

Stableforth, A. W., and A. Galloway: Infectious diseases of animals. Diseases due to bacteria. London: Butterworths 1959.

Taylor, A. W.: Actinobacillosis in sheep. J. comp. Path. **54**, 228 (1954).

Thompson, L., and F. A. Willius: Actinobacillus bacteremia. J. Amer. med. Ass. **99**, 298 (1932).

Wramby, G.: Actinobacillus hos får. Scand. Vet. Tidskr. **30**, 1228 (1940).

Zehetbauer, G., G. Wiedermann u. H. Flamm: Eitrige Conjunctivitis durch Actinobacillus lignieresi. Doccum-Ophthalm. (im Druck).

Doz. Dr. Heinz Flamm und Dr. Gerhard Wiedermann,
Hygiene-Institut der Universität Wien, Wien IX., Kinderspitalgasse 15

Zeitschrift f. Hygiene 148, 375—382 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. R.-E. Bader)

Untersuchungen mit Pasteurella pseudotuberculosis- und Pasteurella pestis-Phagen

Von
Werner Knapp

(Eingegangen am 30. Jannar 1962)

Durch Untersuchungen von Flu (1927), Girard (1942, 1943), Flu u. Flu (1946) wurden Pestphagenstämme bekannt, die auf einzelne Stämme von Escherichia coli, Shigella dysenteriae und Past. pseudotuberculosis lytisch wirken.

Unter weiteren Autoren, die sich mit der lytischen Wirkung von Pestphagenstämmen auch auf Past. pseudotuberculosis (Past. pstbc.) und andere Bakterienarten befaßten, konnten Sugino (1932), Advier (1933) und Bezsonova u. Mitarb. (1938) diese Eigenschaft bei ihren Phagenstämmen nicht feststellen, während Lazarus u. Gunnison (1947) und Gunnison u. Lazarus (1948) mit einem der von Advier (1933) untersuchten Pestphagenstämme vor der Adaptation an Past. pstbc. z.B. 31 von 40 und nach der Adaptation alle getesteten Stämme lysierten. Von 42 getesteten Salmonellastämmen, die 25 verschiedene Species repräsentierten, waren 3 Stämme, und zwar je 1 Stamm von Salm. schottmuelleri, Salm. hirschfeldii und Salm. rubislaw, und von 37 Shigellastämmen 6 gegenüber der konzentrierten Pestphagensuspension empfindlich. Versuche von Gunnison u. Mitarb. (1951), mit Hilfe desselben Pestphagenstammes differentialdiagnostisch Past. pestis und Past. pstbc. zu unterscheiden, führten bei Verwendung einer kritischen Testdosis und einer Brutschranktemperatur von 22° C zu einer Lyse aller Pest-, aber keiner Pseudo tuberkulosestämme.

Eingehende Untersuchungen mit Past. pstbc.-Phagen fehlen, wenn man von den oben erwähnten Untersuchungen mit an Past. pstbc. adaptierten Pestphagen absieht. Der Mitteilung von Girard (1942), daß einige Past. pstbc.-Stämme gegenüber Past. pestis-Phagen dieselbe Empfindlichkeit wie gegen Past. pstbc.-Phagen haben können, fehlen nähere Angaben. Neuerdings gelang es Plankina u. Ogneva (1961), bei einer kleinen Pseudotuberkuloseepidemie unter Murmeltieren den Erreger zu isolieren und bei vier Past. pstbc.-Stämmen Phagenstämme nachzuweisen. Diese Phagen reagierten aber nur mit Past. pstbc.-Stämmen und einem Pest-Vaccinestamm, aber nicht mit Salmonella-, Listeria- und Colistämmen. Die während der Epidemie gezüchteten Past. pstbc.-Stämme wurden außerdem von einem von Kotliarova (1956) beschriebenen Past. pstbc.-Phagenstamm lysiert.

Nachdem bisher eigene Versuche, bei den am Hygiene-Institut gezüchteten und von anderen Instituten zur Nachuntersuchung zugeschickten Stämmen menschlicher und tierischer Herkunft Phagen zu isolieren, erfolglos blieben, bemühten wir

uns, einen Past. pstbc.-Phagenstamm von anderer Seite zu bekommen. Dr. GIRARD (Pasteur-Institut, Paris) stellte uns freundlicherweise einen Pestphagenstamm (Y-Phage) und einen Past. pstbc.-Phagenstamm (PST-Phage) zur Verfügung, der nach seinen Angaben (GIRARD 1960) mit Past. pestis nicht in Berührung gekommen war[1].

In der vorliegenden Arbeit wird über unsere Untersuchungen zu folgenden Fragen berichtet:

I. Ist die Wirkung des PST-Phagenstammes gegenüber Stämmen von Past. pstbc. der serologischen Typen I—V einheitlich, oder lassen sich deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit einzelner Stämme desselben oder der verschiedenen serologischen Typen gegenüber diesem Phagen nachweisen?

II. Bestehen Unterschiede in der lytischen Wirkung des PST-Phagenstammes auf Stämme von Past. pstbc. und Past. pestis nach getrennter Anreicherung der Original-Phagensuspension über Past. pstbc. oder Past. pestis?

III. Wie ist die lytische Wirkung des Pestphagenstammes Y gegen Stämme von Past. pstbc. nach getrennter Anreicherung der Originalphagensuspension über Past. pestis und Past. pstbc?

IV. Kann der PST-Phagenstamm, wie für den Pestphagen Y beschrieben, an Salmonellastämme adaptiert werden, und ist diese Adaptation besonders an die Salmonellastämme möglich, die antigene Beziehungen zu Past. pstc. haben?

V. Ist eine Adaptation von Salmonella-Phagen an Past. pstbc. möglich, und wie verhält sich ein an Past. pstbc. adaptierter Salmonella-Phagenstamm gegen Salmonella-, Past. pstbc.- und Past. pestis-Stämme?

Untersuchungsmaterial

A. Pasteurella-Phagen. *PST-Phage:* Past. pstbc.-Phagenstamm; überlassen von Dr. GIRARD, Pasteur-Institut, Paris.

Y-Phage: Pestphage Stamm Y; überlassen von Dr. GIRARD, Paris.

B. Salmonella-Phagen. *Salmonella typhimurium-Phage 1:* Überlassen von Prof. Dr. BRANDIS, Hygiene-Institut, Göttingen.

Salmonella O-1 Phage: Überlassen von Prof. BRANDIS, Hygiene-Institut, Göttingen.

C. Bakterienstämme. *Past. pseudotuberculosis:* Teststämme der serologischen Typen I—V (Nr. 2^{I}, 16^{II}, 43^{III}, 2200^{III}, 32^{IV}, Ikegaki^{IV}, 25^{V} und 74 R^{I}) sowie weitere im Text der Arbeit aufgeführte Past. pstbc.-Stämme aus der Sammlung des Hygiene-Institutes, Tübingen.

Past. pestis: Avirulente Peststämme mit den Bezeichnungen A 1122, EV 76 und TWJ; überlassen von Prof. Dr. K. F. MEYER, San Francisco.

Salmonella-Stämme: Stämme aus den Sammlungen der Hygiene-Institute Tübingen und Göttingen (Prof. Dr. BRANDIS), Einzelheiten siehe Text.

[1] Leider blieben unsere Bemühungen, die von KOTLIAROVA (1956) bzw. PLANKINA u. Mitarb. (1961) beschriebenen Phagenstämme zur Erweiterung unserer Untersuchungen zur Verfügung gestellt zu bekommen, bisher erfolglos.

D. Nährmedien. Bacto-Proteose-Agar oder -Lösung, Difko (Difko-Manual 1953) zur Durchführung der Phagenversuche an Past. pstbc.- und Salmonella-Stämmen.

Bacto-Tryptose-Agar, Difko (Difko-Manual 1953); Tryptose-Bouillon: [Pepton 20 g (Merck), Kochsalz 5 g, Dextrose 1 g, Fleischwasser 1000 ml] zur Durchführung der Phagenversuche an Past. pestis[1].

Untersuchungsmethodik

Die Adaptation der Phagen an die verschiedenen Bakterienstämme und ihre anschließende Anreicherung erfolgte, soweit nicht besonders beschrieben, mit der als bekannt vorausgesetzten Technik in flüssigen oder auf festen Nährmedien (Lit. bei Brandis 1957; Adams 1959 u. a.). Die Austestung der Phagensuspensionen erfolgte in der Regel mit der Ösen- und nur für einzelne Kontrollversuche mit der Overlay-Methode.

Untersuchungen zu I

Nach getrennter Anreicherung des PST-Phagen über 7 verschiedene Teststämme von Past. pstbc. Typ I—V (Stamm Nr. 2^{I}, 16^{II}, 43^{III}, 2200^{III}, 32^{IV}, Ikegaki^{IV} und 25^{V}) wurden die 7 Phagenanreicherungen gegen 42 Past. pstbc.-Stämme, d. h. 14 Stämme von Typ I, 10 Stämme von Typ II, 5 Stämme von Typ II, 4 Stämme von Typ IV und 9 Stämme von Typ V, getestet. Sämtliche Phagenanreicherungen, die auf die $^1/_2$—1 Std vorbebrüteten Kulturen mit einer Öse übertragen wurden, führten mindestens bis zur Verdünnung 10^{-4} zur konfluierenden Lyse des zur Anreicherung verwendeten Stammes und bis zur Verdünnung 10^{-6} bzw. 10^{-9} zu zahlreichen oder vereinzelten Löchern (Plaques) im Tropfenbereich. Alle Phagensuspensionen wurden konzentriert und in Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-3} getestet. Von der Verwendung einer kritischen Testdosis, d. h. der Konzentration, die beim Auftropfen auf den homologen Stamm eben noch zu einer konfluierenden Lyse führt, wurde bei diesen Versuchen abgesehen.

Die über Past. pstbc. Stamm 2^{I}, 16^{II}, 32^{IV}, Ikegaki^{IV} und 25^{V} angereicherten und bis 10^{-3} verdünnten Phagensuspensionen führten bei den meisten Past. pstbc.-Stämmen von Typ I, II, III und V zu einer konfluierenden Lyse. Bei den 4 Past. pstbc.-Stämmen von Typ IV wurden dagegen im Tropfenbereich nur zahlreiche oder einzelne Plaques, aber keine konfluierende Lyse gesehen. Auffallend war die geringere Empfindlichkeit der Past. pstbc.-Stämme Typ I, II, IV und V gegenüber den über Past. pstbc. Stamm Nr. 43^{III} und 2200^{III} angereicherten Phagensuspensionen, die bei der größeren Zahl der Stämme nur konzentriert oder in der Verdünnung 10^{-1} zu konfluierender Lyse oder Plaques führten, während bei den zur Anreicherung verwendeten Stämmen von Typ III auch noch die Phagenverdünnung 10^{-4} eine konfluierende Lyse bewirkte.

[1] Herrn Prof. Dr. K. F. Meyer, Prof. Dr. Brandis und Dr. Girard sei auch an dieser Stelle für die freundliche Überlassung der Stämme und Herrn Prof. Dr. Brandis für seine wertvollen Ratschläge bei der Durchführung der zu Frage IV erforderlichen Versuche sehr herzlich gedankt.

Innerhalb der Gattung Pasteurella reagierten mit dem über Past. pstbc. Stamm Nr. 2^{I} angereicherten PST-Phagen nur 3 uns zur Verfügung stehende avirulente Peststämme, aber nicht 18 Past. multocida- und 4 Past. tularensis-Stämme. Ebensowenig konnte bei 20 Coli-, 12 Shigella-, je 5 Pseudomonas- bzw. Klebsiella- und 6 Hämophilus-Stämmen eine Wirkung des PST-Phagen nachgewiesen werden.

In Beantwortung der ersten Frage ist somit festzustellen, daß der PST-Phage eine hohe spezifische Wirkung auf Past. pstbc.-Stämme besitzt und ein zusätzliches Hilfsmittel für die Artdiagnose darstellt. In Ländern mit Pestvorkommen muß aber die differentialdiagnostische Abgrenzung von Past. pestis — z. B. nach dem Verfahren von GUNNISON u. Mitarb. 1951 — berücksichtigt werden. In der Empfindlichkeit der einzelnen Stämme von Past. pstbc. gegenüber den verschiedenen Anreicherungen des PST-Phagen bestehen Unterschiede, doch wurden alle Stämme der serologischen Typen I—V durch den PST-Phagen erfaßt.

Offen bleiben noch die Fragen, ob unsere nur mit dem PST-Phagen gemachten Beobachtungen auch für andere Past. pstbc.-Phagenstämme gelten, und ob durch Adaptation des PST-Phagen an geeignete Past. pstbc.-Stämme oder Auffinden weiterer Phagenstämme eine Lysotypisierung von Past. pstbc.-Stämmen möglich ist.

Untersuchungen zu II und III

Anreicherungen des *PST-Phagen* über Past. pstbc.-Stamm 2^{I} (Titer: konfluierende Lyse bis 10^{-5}, zahlreiche bzw. einzelne Plaques bis 10^{-7} bzw. 10^{-9} der Phagenverdünnung) und über Past. pestis-Stamm A 1122 (Titer: konfluierende Lyse bis 10^{-9} zahlreiche bzw. einzelne Plaques bis 10^{-11} der Phagenverdünnung) bzw. Anreicherungen des *Y-Phagen* über Past. pestis-Stamm A 1122 (Titer: konfluierende Lyse bis 10^{-5}, zahlreiche oder einzelne Plaques bis 10^{-8} bzw. 10^{-10}) oder Past. pstbc.-Stamm 2^{I} (Titer: konfluierende Lyse bis 10^{-7}, zahlreiche oder einzelne Plaques bis 10^{-11}) wurden wie unter I. gegen 42 Past. pstbc.-Stämme und 3 Past. pestis-Stämme ausgetestet.

Folgende kurz zusammengefaßte Ergebnisse wurden erhalten:

Über Past. pstbc.-Stamm Nr. 2^{I} angereichert, führte der PST-Phage bei 39 Stämmen von Past. pstbc. Typ I—V in der Verdünnung 10^{-3} (höchste Verdünnung) bzw. bei 3 Stämmen nur in der Verdünnung 10^{-2} oder 10^{-1} zu einer konfluierenden Lyse im Tropfenbereich. Dagegen wurde nach der Anreicherung über Past. pestis-Stamm A 1122 mit der bis 10^{-3} verdünnten PST-Phagensuspension bei 7 Stämmen (1 Stamm Typ I, 4 Stämme Typ II und 2 Stämme Typ IV) und mit der konzentrierten oder 1:10 verdünnten Phagensuspension bei 31 Stämmen von Typ I und V eine konfluierende Lyse gesehen. Bei 4 Past. pstbc.-Stämmen Typ II, die kulturell und biochemisch keine Besonderheiten zeigten, blieb eine Reaktion mit dem PST-Phagen entweder aus (Stamm Nr. 784 und 255), oder es waren nur mit der konzentrierten

Phagensuspension zahlreiche oder einzelne Plaques im Bereich des Phagentropfens nachweisbar (Stamm Nr. 792 und 798).

Beide bis 10^{-3} verdünnten PST-Phagenanreicherungen führten aber bei den 3 Peststämmen zu einer konfluierenden Lyse.

Nach Anreicherung des Pestphagenstammes Y über Past. pestis-Stamm A 1122 oder Past. pstbc.-Stamm Nr. 2^{I} und Austestung der beiden Phagensuspensionen an Past. pstbc. wurden die in der Tabelle zusammengestellten Ergebnisse erzielt:

Tabelle. *Reaktion von Past. pstbc. mit Pestphage Y angereichert über Past. pestis und Past. pstbc.*

Past. pstbc.		Pestphage Y angereichert über	
Serologischer Typ	Anzahl der Stämme	Past. pestis-Stamm A 1122*	Past. pstbc.-Stamm Nr. 2^{I}
		Zahl der reagierenden Stämme	
I	13	4	9
	1 (74 R)	1	1
II	10	1 (Stamm Nr. 16)	6
III	5	4	5
IV	4	1 (Stamm Saisawa)	2
V	9	0	5
Gesamtzahl	42	11	28

* In der Verdünnung 10^{-3} konfluierende Lyse bei Past. pestis-Stamm A 1122, EV 76 und TWJ.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, reagierten mit den über Past. pestis Stamm A 1122 bzw. Past. pstbc.-Stamm Nr. 2^{I} angereicherten Suspensionen des Pestphagen Y 11 (Typ I—IV) bzw. 29 Past. pstbc.-Stämme (Typ I—V). Die Stärke der lytischen Wirkung dieser und weiterer über Past. pstbc.-Stamm Nr. 1779^{II}, $Ikegaki^{IV}$ und 25^{V} gewonnenen Phagensuspensionen bzw. die Empfindlichkeit der einzelnen Stämme von Past. pstbc. Typ I—V gegenüber den verschiedenen Anreicherungen der Y-Phagen war uneinheitlich, so daß Gesetzmäßigkeiten nicht festgestellt werden konnten.

Der über Past. pestis-Stamm A 1122 angereicherte Pestphage Y führte nur bei 2 Stämmen von Past. pstbc. Typ III (Nr. 2200 und H 21) noch in der Verdünnung 10^{-3} zu einer konfluierenden Lyse, während bei 2 weiteren Stämmen von Typ III oder bei 5 von 14 Stämmen von Typ I und bei je 1 Stamm von Typ II und IV nur mit der konzentrierten oder 1:10 verdünnten Phagensuspension einzelne Plaques gesehen wurden. Mit der über Past. pstbc.-Stamm Nr. 2^{I} gewonnenen und bis 10^{-3} verdünnten Anreicherung des Pestphagen Y wurde bei allen Past. pstbc.-Stämmen Typ III eine konfluierende Lyse ausgelöst. Mit dieser Phagenanreicherung reagierten je 4 Past. pstbc.-Stämme Typ I (Nr. 1323, 842, H 19, 1147), Typ II (Nr. 255, 256, 257, 798), Typ V (Nr. 799, 801, 802, 805) und 2 Stämme Typ IV

(Nr. 32 und Saisawa) nicht. Die unter II. und III. gestellten Fragen können somit wie folgt beantwortet werden:

Die Unterschiede in der lytischen Wirkung der beiden durch Anreicherung über Past. pstbc.-Stamm Nr. 2^{I} oder Past. pestis-Stamm A 1122 gewonnenen PST-Phagenanreicherungen auf Past. pstbc.-Stämme Typ I bis V sind vor allem quantitativer Art. Außer 2 Stämmen (Nr. 784^{II} und 255^{II}) reagierten alle Past. pstbc.-Stämme mit beiden verschiedenen Anreicherungen des PST-Phagenstammes, doch war der Titer der über Past. pestis angereicherten PST-Phagensuspension niederer.

Die Unterschiede in der lytischen Wirkung der entsprechend gewonnenen beiden Y-Phagenanreicherungen auf Past. pstbc.-Stämme Typ I—V sind nicht nur quantitativer, sondern auch qualitativer Art. Ein Vergleich der Wirkung der beiden Phagenanreicherungen zeigt, daß nach der Anreicherung des Y-Phagen über Past. pstbc.-Stamm Nr. 2^{I} eine wesentlich größere Zahl von Past. pstbc.-Stämmen Typ I—V als mit der über Past. pestis-Stamm A 1122 gewonnenen Anreicherung erfaßt wurde. Die Adaptation des Y-Phagen an Past. pstbc.-Stamm Nr. 2^{I} als heterologen Stamm hatte, wie zu erwarten, zu einer Zunahme seiner lytischen Eigenschaften gegenüber Past. pstbc.-Stämmen Typ I—V geführt.

Untersuchungen zu IV

Auf die einzelnen Versuche wird in dieser Arbeit nicht eingegangen, da sie keinen sicheren Beweis einer Adaptation des getrennt über Past. pstbc.-Stamm Nr. 16^{II} bzw 32^{IV} angereicherten PST-Phagen an S. typhimurium (Nr. 9) und S. schottmuelleri (Nr. 3) bzw. S. enteritidis (Nr. 64) und S. gallinarum pullorum (Nr. 74) erbrachten. So konnte z. B. in einer Versuchsreihe mit einem Filtrat von 20 S. typhimurium-Kulturen auf Proteoseagarplatten, die nicht mit PST-Phagen beimpft waren, bei 4 von 21 getesteten Salmonellastämmen die gleiche lytische Wirkung beobachtet werden, wie mit der dritten Filtratpassage von S. typhimurium-Kulturen, die beim ersten Ansatz mit PST-Phagen beschickt worden waren. In anderen Versuchsreihen mit und ohne PST-Phagen wurden dagegen in keiner der zahlreichen Filtratpassagen gegen Salmonellastämme virulente Phagen nachgewiesen. Diese Beobachtungen können aber, solange keine weiteren Untersuchungsergebnisse mit anderen Past. pstbc.-Phagenstämmen bzw. Salmonellastämmen vorliegen, nicht verallgemeinert werden.

Untersuchungen zu V

Eine Adaptation des Salmonella O_1-Phagen und des Salmonella typhimurium Phagen Nr. 1 an Past. pstbc. Stamm Nr. 2^{I}, 16^{II}, 43^{III}, 2200^{III}, Ikegaki^{IV}, 32^{IV}, 25^{V}, 74 R (Rauhstamm von Past. pstbc. Typ I; THAL 1954) oder an Past. pestis-Stamm A 1122, TWJ und EV-76 gelang uns

in zehn und mehr Passagen auf flüssigen und festen Nährböden, auch mit Hilfe von UV-Bestrahlung oder Beschallung der Kulturen, nicht.

Die eingangs gestellte Frage kann daher für die beiden von uns verwendeten Salmonellaphagen nicht bejaht werden, doch sind auch hier, solange nicht weitere Beobachtungen mit anderen Salmonellaphagen und anderer Versuchstechnik vorliegen, keine endgültigen Rückschlüsse möglich.

Zusammenfassung

Es wird über Untersuchungen mit einem Past. pstbc.-Phagen (PST-Phagen) und einem Past. pestis-Phagen (Pestphage Y) zu fünf der Arbeit zugrunde liegenden Fragen berichtet. Mit dem PST-Phagen reagierten unter den im einzelnen beschriebenen Voraussetzungen die 42 getesteten Stämme von Past. pstbc. Typ I—V und innerhalb der Gattung Pasteurella die 3 uns zur Verfügung stehenden Pest-, aber keine Past. multocida- und Past. tularensis-Stämme. In Ländern ohne Pestvorkommen kann der PST-Phage ein wertvolles Hilfsmittel für die Artdiagnose sein. Die Anreicherung des PST-Phagen über Past. pestis führte zu einer Abnahme der lytischen Wirkung auf Past. pstbc.-Stämme, ohne daß sich die Zahl der erfaßten Stämme von Past. pstbc. Typ I—V verringerte. Die Anreicherung des Pestphagen Y über Past. pstbc.-Stämme war dagegen von einer Zunahme der lytischen Wirkung und der Zahl der erfaßten Stämme von Past. pstbc. Typ I—V gefolgt. Der sichere Nachweis einer Adaptation des PST-Phagen an Salmonellastämme und der Salmonellaphagen an Past. pstbc.- und Past. pestis-Stämme konnte nicht erbracht werden.

Literatur

Adam, M. H.: Bacteriophages. New York: Interscience Publisher 1959.

Advier, M.: Etude d'un bactériophage antipesteux. Bull. Soc. Path. exot. **26**, 94—99 (1933).

Bezsonova, A.; P. F. Molodtsova, O. N. Mosolova, B. E. Osolinker, A. N. Krainova, B. A. Pronin, R. I. Timofeeva, M. S. Shaposhnikov, A. G. Sokolinskaia, N. I. Kashkina, A. M. Petrunina, K. A. Goriunova and A. S. Temiakova: O diferentsiatsii B. pestis i B. pseudotuberculosis rodentium Pfeiffer a pri pomoshchi chumnovo bacteriofaga. Rev. Microbiol. Saratov **17**, 228—231 (1938).

Brandis, H.: Die Anwendung von Phagen in der bakteriologischen Diagnostik mit bes. Berücksichtigung der Typisierung von Typhus- und Paratyphus B-Bakterien sowie Staphylokokken. Ergebn. Mikrobiol. **33**, 96—159 (1957).

Brandis, H.: Persönliche Mitteilungen (1961).

Flu, P. C.: Sur la nature du bactériophage. C. R. Soc. Biol. (Paris) **96**, 1148—1149 (1927).

Flu, P., and H. Flu: At n. Leeuwenhoek **11**, 195 (1946; zit. nach Pollitzer, R. In: Plaque: World Health Org. Series No. 22, S. 171).

Girard, G.: Sur quelques nouveaux caractères differenciant les bacilles de la peste et de la pseudotuberculose des pasteurella. Ann. Inst. Pasteur **68**, 476—478 (1942).

Girard, G.: Sensibilité des bacilles pesteux et pseudo-tuberculeux, d'une parte des germes du groupe coli-dysentérique d'autre past aux bactériophages homologues. Ann. Inst. Pasteur **69**, 52—54 (1943).

Girard, G.: briefliche Mitteilung (1960).

Gunnison, J. B., and A. S. Lazarus: Alteration of Past. pestis bacteriophage following successive transfer on Past. pseudotuberculosis and on Shigella. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **69**, 294—296 (1948).

Gunnison, J. B., A. Larson and A. S. Lazarus: Rapid differentiation between Past. pestis and Past. pseudotuberculosis by action of bacteriophage. J. infect. Dis. **88**, 254—255 (1951), mit weiterer Literaturangabe.

Gunnison, J. B., M. C. Shevki, V. K. Zion and M. J. Abbot: Lysis of Past. pseudotuberculosis by bacteriophage. J. infect. Dis. **88**, 187—193 (1951).

Kotliarova, R. I.: Der Pseudotuberculose-Phage und seine Eigenschaften (in russ.) Trudi nauchno-issledovatelskogo protivochumnogo instituta kavkaza i Zavkakaza (Mitteilungen des Anti-Pest-Institutes des Kaukasus und Transkaukasus) 1956, S. 234—241.

Lazarus, A. S., and J. B. Gunnison: The action of Past. pestis bacteriophage on strains of Pasteurella, Salmonella and Shigella. J. Bact. **53**, 705—714 (1947).

Plankina, Z. A., u. N. S. Ogneva: Ein Fall der Isolierung von Pseudotuberkulosekeimen aus Murmeltieren (in russ.) Ž. Mikrobiol. (Mosk.) **32**, 124—127 (1961).

Sugino, T.: On the bacteriophage against the plaque bacillus. Kitasato Arch. exp. Med. **9**, 72—81 (1932).

Thal, E.: Untersuchungen über Past. pseudotuberculosis. Lund 1954.

Prof. Dr. W. Knapp,
Hygiene-Institut der Universität, 74 Tübingen

Zeitschrift f. Hygiene 148, 383—404 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. Habs)

Quantitative und qualitative Untersuchungen über die anaeroben Lactobacillen im Säuglings- und Erwachsenenstuhl

Beitrag zum Bifidus-Problem*

Von

H. P. R. Seeliger und H. Werner

(Eingegangen am 8. Januar 1962)

Einleitung

Seit der Erstbeschreibung der Bifidusbakterien durch Tissier[54] ist eine umfangreiche, sich oft widersprechende Literatur entstanden (Übersicht siehe Boventer[3]). Nicht nur von pädiatrischer Seite sind dabei die „allgemein biologischen" und ernährungsphysiologisch-klinischen Aspekte, manchmal recht einseitig, in den Vordergrund gerückt worden, sondern auch fast alle bakteriologischen Beiträge befaßten sich bis vor kurzem vorwiegend mit Wuchsstoff-Fragen, der Vitaminbildung, den symbiontischen Leistungen usw. Leider unterblieben in vielen Fällen die genaue bakteriologische Analyse und Beschreibung der als Bifidusbakterien angesprochenen Keime. Daraus ergab sich, wie Dehnert in seiner kritischen Literaturübersicht[5] ausführt, die erstaunliche Tatsache, daß den verschiedenen Untersuchungsergebnissen oftmals ganz verschiedene Keime zugrunde liegen und jene somit schwer vergleichbar sind.

Angesichts der seit einigen Jahren erneut in Gang gekommenen Diskussion um die Bedeutung und Häufigkeit von Milchsäurebakterien in menschlichen Stuhlproben und anderen Untersuchungsmaterialien erschienen Versuche zur genauen taxonomischen Einordnung der grampositiven stäbchenförmigen Stuhlkeime, somit vor allem der Angehörigen des Genus *Lactobacillus*, ebenso dringend erforderlich wie ihre möglichst genaue Beschreibung.

Für die aeroben Lactobacillen ist diese Forderung inzwischen durch die Arbeiten von Rogosa u. a.[26,46] in befriedigender Weise erfüllt, und für die strikt anaeroben Lactobacillen, d. h. definitionsgemäß für Bifidusbakterien, gab Dehnert ein brauchbares Differenzierungsschema[6], während sich Petuely[36–44] mit dem Wuchsstoffproblem und der

* Durchgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Entwicklung einer serologischen Bifidusdiagnostik mittels fluorescierender Antikörper befaßte.

Aufbauend auf diesen wichtigen Ansätzen zu einer Bifidusbakteriologie sollen die eigenen bakteriologischen und orientierenden serologischen Untersuchungen einen Beitrag zu der noch weitgehend ungeklärten Problematik in methodischer und systematischer Hinsicht leisten.

A. Bakteriologie

Fragestellung

Nachdem in umfangreichen Vorversuchen die Leistungsfähigkeit der eigenen Methodik gesichert war, wurden gezielte Untersuchungen vor allem unter der folgenden Fragestellung durchgeführt:

1. In welchen Mengen kommen die strikt anaeroben, zur Verzweigung befähigten grampositiven Stäbchen im Stuhl von Säuglingen und Erwachsenen vor, und in welchen Relationen stehen sie zu den anderen Stuhlkeimen?

2. Handelt es sich dabei jeweils um eine einheitliche Population, oder liegen Gemische verschiedener Biotypen bzw. Arten vor?

3. Züchten wir mit jedem der verschiedenen Nährböden jeweils nur einen gewissen Anteil aus einer heterogenen Population grampositiver Anaerobier[6]?

4. Ist die Reinzüchtung dieser Keime wirklich so schwierig, wie von einzelnen Autoren[2,3,6] angegeben wird?

5. Sind die in Stühlen von Säuglingen und Erwachsenen isolierten Bifidusstämme als identisch zu betrachten (vgl. auch Abschnitt B „Serologie")?

Die Lösung dieser Fragen wurde in verschiedener Weise angestrebt: a) mittels zweier Methoden (Oberflächentropfverfahren nach Aussaat kleiner Volumina der Stuhlaufschwemmung und Untersuchung großer Volumina der Stuhlverdünnungen im Membranfilterverfahren) auf jeweils mehreren, zur Bifiduszüchtung brauchbaren Nährböden; b) Subkultur von Einzelkolonien aus höchsten Stuhlverdünnungen wiederum auf allen verwendeten Nährböden und c) anschließende makroskopische Kontrolle der Kolonien sowie mikroskopische und biochemische Überprüfung der Reinkulturen.

Methodik

Die Aufbewahrung der Stuhlproben von gesunden Brustkindern und Erwachsenen erfolgte bis zur endgültigen Verarbeitung in der Tiefkühltruhe bei −15°C bis −18°C. Anschließend wurden abgewogene Stuhlmengen mittels steriler Glasperlen homogenisiert und geometrische Verdünnungsreihen in sterilen Zentrifugenröhrchen (5 ml Inhalt) und parallel in sterilen Meßkolben (250 ml Inhalt) hergestellt. Je 0,1 ml der Verdünnungen $1:10^2$ bis $1:10^9$ wurden im Oberflächentropfverfahren verimpft und parallel dazu je 100 ml der Verdünnungen $1:10^9$ bis $1:10^{11}$ mittels Membranfilter (Sartorius) untersucht.

Die zur Bifiduszüchtung sowie zur Bestimmung des übrigen aeroben und anaeroben Keimgehalts benutzten Nährböden sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Die Bifidusnährböden wurden 3 Tage bei 37°C, die übrigen Anaerobiernährböden 10—12 Tage bei 37°C unter Verwendung des Brewerschen Anaerobiertopfes (Einleiten von Leuchtgas nach Evakuieren, nachfolgende katalytische Verbrennung des Restsauerstoffs) bebrütet. Die Keimzählung erfolgte unter makroskopischer und mikroskopischer Kontrolle.

Die Bifidusbakterien wurden auf den auch zur Isolierung verwendeten, verschiedenen Nährböden unter zwei- bis dreitägiger anaerober Bebrütung reingezüchtet. Die Reinkulturen wurden nach makroskopischer und mikroskopischer Kontrolle und Katalaseprobe (auf dem Objektglas) unverzüglich in die zur biochemischen Testung bestimmten Substrate, die kurz vorher erhitzt und dann abgekühlt worden waren, überimpft. Die Teströhrchen wurden mit hitzeverflüssigtem, bald erstarrendem Paraffin überschichtet und 3 Wochen bei 37°C bebrütet.

Bei der biochemischen Kontrolle der Bifidusreinkulturen wurden außer den von Dehnert[6] angegebenen 24 Zuckern noch einige seltene Pentosen (Fucose, Pentaerythrit) sowie Indolbildung, Nitratreduktion, Acetoinbildung, Äsculinspaltung und das Vorhandensein der sauren und alkalischen Phosphatase geprüft. Bei einem Teil der Untersuchungen wurde die Testung der Kohlenhydratspaltung auf 13 differentialdiagnostisch wichtige Zucker beschränkt, und zwar auf: Lactose, Arabinose, Xylose, Dextrin, Galaktose, Mannose, Trehalose, Raffinose, Salicin, Inulin, Sorbitol, Inositol und Mannitol. Die Kohlenhydrate wurden in 1%iger Konzentration in einem Basismedium folgender Zusammensetzung geprüft:

Fleischextrakt	3,0 g
Bacto-Pepton	10,0 g
NaCl	5,0 g
Bromkresolpurpurlösung (1,6%ig)	2,0 ml
Aqua dest.	ad 1000,0 ml.

Als Bifidusbakterien *(Lactobacillus bifidus)* wurden nur solche sporenlosen, grampositiven, *strikt anaeroben*, katalasenegativen, unbeweglichen, zur Verzweigung sowie zur Bildung von Blasen, Keulen und Granulierungen befähigten Stäbchen angesprochen, die keine Nitratreduktion, keine Indolbildung und keine Gelatineverflüssigung zeigten und sich auf Grund ihrer Kohlenhydratspaltung in die von Dehnert[6] beschriebenen Gruppen einordnen ließen.

Ergebnisse

Aus einer Reihe von Untersuchungen sind in Tab. 2—4 die Ergebnisse von 10 Stuhlanalysen 6 ausschließlich frauenmilchernährter Säuglinge (Brustkinder) und von 3 Erwachsenen zusammengefaßt, bei denen es gelang, jeweils eine repräsentative Anzahl von Bifiduskolonien in Subkulturen rein weiterzuzüchten (zwischen 9 und 29, insgesamt 151) und biochemisch zu prüfen.

Wie aus Tab. 2 ersichtlich, waren im Stuhl der sechs Brustkinder auf verschiedenen, zur Bifiduszüchtung brauchbaren Nährböden im Oberflächentropf-, Hochschicht- und Membranfilterverfahren regelmäßig $n \cdot 10^9$ bis $n \cdot 10^{10}$ Bifidusbakterien pro Gramm züchtbar. Häufig, aber nicht regelmäßig, konnten diese Keime auch aus Erwachsenenstühlen in

Tabelle 1. *Übersicht über die zur aeroben und anaeroben Stuhlanalyse unter besonderer Berücksichtigung der Bifidusbakterien benutzten Nährböden und Kulturverfahren*

Vornehmlich isolierte Keimart bzw. Keimgruppe	Nährböden	Kulturverfahren	Verdünnungsstufen	Bebrütung
Bifidusbakterien	Schafblutagar Blutagar nach Hackenthal-Bierkowski Frauenmilchagar nach Dehnert L-Agar (Lactalysate Agar BBL) LBS-Agar (Lactobacillus-Selection Medium BBL) TS-Agar (Tomato-Juice Agar BBL) Lactobacilli Agar AOAC (Difco) B-Agar (Brewer Anaerobic Agar, Difco)	Oberflächentropfverfahren	$1:10^4$ bis $1:10^9$	2—3 Tage bei 37°C im Brewerschen Anaerobiertopf unter Verwendung von Leuchtgas
	L-Agar TS-Agar LBS-Agar	Hochschichtröhrchen	$1:10^4$ bis $1:10^9$	5—10 Tage bei 37°C
	Frauenmilchagar L-Agar Brewer Anaerobic Agar	Membranfilter	$1:10^9$ bis $1:10^{11}$	3—5 Tage anaerob bei 37°C
Anaerobier (bes. Bacteroides-Gruppe)	Schafblutagar Endo-Agar	Oberflächentropfverfahren	$1:10^5$ bis $1:10^9$ $1:10^4$ bis $1:10^8$	10—12 Tage anaerob
Enterobacteriaceen u. a. gramnegative Keime	MacConkey-Agar Endo-Agar	Oberflächentropfverfahren	$1:10^3$ bis $1:10^8$	2-3- Tage aerob bei 37°C
eine Vielzahl aerober Keime	Schafblutagar		$1:10^4$ bis $1:10^9$	2—3 Tage aerob bei 37°C
aerobe Lactobacillen	LBS-Agar L-Agar Snyder-Agar (BBL) TS-Agar Blutagar nach Hackenthal-Bierkowski		$1:10^4$ bis $1:10^8$	3—5 Tage aerob bei 37°C
Sproßpilze	Sabouraud-Agar (mit Antibioticazusatz) Littman-Agar		$1:10^2$ bis $1:10^4$	7—10 Tage aerob bei 30°C und 37°C

Tabelle 2. *Bifiduskeimzahlen in sechs Brustkind- und vier Erwachsenenstühlen auf den verschiedenen Nährböden im Oberflächentropf-, Hochschicht- und Membranfilterverfahren**

Stuhlprobe von	im Oberflächentropfverfahren auf					im Hochschichtröhrchen (L-Agar)	im Membranfilterverfahren auf		
	Schafblutagar	Frauenmilchagar	L-Agar	B-Agar	sonstige Nährböden		Frauenmilchagar	L-Agar	sonstige Nährböden
Säugling A	$5 \cdot 10^9$	—	$6 \cdot 10^9$	—	TS-Agar $4 \cdot 10^8$	—	—	$8 \cdot 10^8$	Schafblutagar $6 \cdot 10^8$
Säugling B	$2 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^{10}$	—	—	$2 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	—
Säugling C	$4 \cdot 10^9$	—	$2 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^9$	TS-Agar $1 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^9$	—
Säugling D	$1 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$	—	$1 \cdot 10^9$	—	$2 \cdot 10^9$	B-Agar $1 \cdot 10^9$
Säugling E	$>1 \cdot 10^9$	—	$9 \cdot 10^9$	—	AOAC-Agar $1 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^9$	—	$2 \cdot 10^9$	B-Agar $4 \cdot 10^9$
Säugling F	$4 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	—	$>4 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^8$	—
Erwachsener A_1**	$2 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$	—	$1 \cdot 10^9$	$>7 \cdot 10^8$	$>7 \cdot 10^8$	—
Erwachsener A_2**	$2 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^9$	LBS-Agar $5 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$	—
Erwachsener B	$1 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$	—	$2 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^7$	—
Erwachsener C	$6 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^9$	Hackenthal-Bierkowski-Agar $8 \cdot 10^9$ LBS-Agar $2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	—

* Erklärung der Abkürzungen siehe Tab. 1.

** A_1 und A_2 = Zwei Stuhlproben vom gleichen Erwachsenen, gewonnen im Abstand von 3 Wochen.

Tabelle 3. *Übersicht über die Keimzahlen pro Gramm in den sechs Brustkind- und vier Erwachsenenstühlen*

Stuhlprobe von	Bifidusbakterien	gramnegative Anaerobier (Bacteroides-gruppe)	E. coli und andere Entero-bacteriaceen	Staphylokokken (S) u. Strepto-kokken (Sr.)	aerobe Lactobacillen	sonstige Keime	Verhältnis Bifidusbakterien übrige Keime
Säugling A	$6 \cdot 10^9$	—	$2 \cdot 10^6$ ($1 \cdot 10^7$)	$1 \cdot 10^7$ S	—	—	≈300:1
Säugling B	$2 \cdot 10^{10}$	—	$2 \cdot 10^9$ ($2 \cdot 10^9$)	$3 \cdot 10^7$ S	—	—	≈ 10:1
Säugling C	$2 \cdot 10^{10}$	—	$3 \cdot 10^9$ ($3 \cdot 10^9$)	—	$5 \cdot 10^8$	$>1 \cdot 10^6$ Bacillen $>1 \cdot 10^4$ Hefen	≈ 6:1
Säugling D	$2 \cdot 10^9$	—	$6 \cdot 10^7$ ($2 \cdot 10^8$)	$4 \cdot 10^7$ S $2 \cdot 10^6$ Sr	—	—	≈ 8:1
Säugling E	$9 \cdot 10^9$	—	$2 \cdot 10^8$ ($4 \cdot 10^9$)	$>1 \cdot 10^6$ S	—	—	≈ 2:1
Säugling F	$4 \cdot 10^9$	—	$1 \cdot 10^8$ ($1 \cdot 10^9$) $3 \cdot 10^6$ Klebsiellen	$1 \cdot 10^8$ S	$3 \cdot 10^8$	—	≈ 3:1
Erwachsener A_1	$2 \cdot 10^9$	$>2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^7$ ($1 \cdot 10^8$)	$3 \cdot 10^5$ S	—	$1 \cdot 10^3$ Hefen	≈ 1:1
Erwachsener A_2	$4 \cdot 10^9$	—	$1 \cdot 10^7$ ($2 \cdot 10^8$)	$1 \cdot 10^9$ S $1 \cdot 10^8$ Sr	$6 \cdot 10^7$	—	≈ 3:1
Erwachsener B	$9 \cdot 10^8$	$>1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$ ($1 \cdot 10^7$)	$1 \cdot 10^7$ S $5 \cdot 10^6$ Sr	$2 \cdot 10^8$	—	≈ 3:1
Erwachsener C	$8 \cdot 10^9$	$>1 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^7$ ($3 \cdot 10^8$)	—	—	$1 \cdot 10^3$ Hefen	≈ 5:1

fast den gleichen Mengen gezüchtet werden, ohne daß dabei im gramgefärbten Stuhlausstrich schlanke grampositive Stäbchen im gleichen Maße vorherrschten.

Auch im Säuglingsstuhl kommt das Überwiegen der grampositiven Stäbchen (Bifidusbakterien), vor allem wohl wegen der oft recht hohen Colizahlen, nicht immer entsprechend zum Ausdruck. — In Tab. 3 ist für Bifidusbakterien jeweils die maximale der auf den verschiedenen Nährböden ermittelten Keimzahlen eingesetzt. Die als aerobe Lactobacillen eingeordneten Keime wurden fast ausschließlich unter anaeroben Bedingungen isoliert, erwiesen sich jedoch bei Subkultur als Aerobier. Die erste Zahl in der Spalte „E. coli und andere Enterobacteriaceen" gibt die Colikeimzahl nach aerober Kultur auf Endo-Agar an, während in Klammern das Ergebnis der anaeroben Kultur auf Schafblutagar steht. Bei vier Säuglings- und drei Erwachsenenstühlen liegt die Colizahl nach anaerober Kultur um eine Zehnerpotenz höher als nach aerober Kultur auf Endo-Medium bzw. MacConkey-Agar.

Gramnegative Anaerobier der *Bacteroides*-Gruppe und verwandter Arten wurden in den untersuchten Verdünnungen der Brustkindstühle nicht nachgewiesen. Dagegen fanden sie sich in den Stuhlproben der Erwachsenen in Mengen von 10^6 bis 10^9 pro Gramm.

Nach dem Ergebnis der biochemischen Testung von 151 reingezüchteten Bifidusabimpfungen lag in zwei Brustkind- und in zwei Erwachsenenstühlen ein Gemisch verschiedener Biotypen des *Lactobacillus bifidus* vor. Bei vier Brustkindern (von der gleichen Neugeborenenstation) schien es sich um eine Monokultur des biochemischen Typs III (Arabinose- und Xylose-negativ, Salicin-, Mannitol- und Sorbitol-positiv) zu handeln. Aus zwei Erwachsenenstühlen wurden nur Bifidusbakterien des Biotyps V (Arabinose- und Xylose-positiv) isoliert (vgl. Tab. 4).

In Bestätigung früherer Beobachtungen[22,27,48] konnten nicht selten kleine, erhabene, weißliche Kolonien inmitten von *aeroben* Colikulturen als Bifidusbakterien identifiziert werden. Sieben Abimpfungen aus dem Erwachsenenstuhl C wurden aus einer solchen Symbiose mit Colibakterien isoliert, dann *anaerob* reingezüchtet und biochemisch geprüft. Diese sieben Abimpfungen gehörten ebenso zum Biotyp V wie die 22 Subkulturen aus anaerober Erstisolierung.

In Tab. 5 ist das Ergebnis einiger vergleichender Untersuchungen mitgeteilt, die mit von Haenel und Herrmann aus Erwachsenenstuhl und aus der Vagina isolierten Stämmen durchgeführt wurden. Die Stämme Nr. 1—3 waren uns als Bifidusbakterien der Gruppe V bzw. I/II übergeben worden. Die Stämme Nr. 4—7 waren nur auf Grund der kulturellen und morphologischen Eigenschaften als „Bifidus" bezeichnet worden. Die Prüfung der morphologischen und kulturell-biochemischen

Tabelle 4. *Biochemische Analyse der im Stuhl von sechs ausschließlich mit Frauenmilch ernährten Säuglingen und in vier Erwachsenenstühlen gezüchteten Bifidusbakterien**

Stuhlproben von	Anzahl der geprüften Abimpfungen	Biochemische Gruppe nach Dehnert				Isolierung und Subkulturen auf
		I/II	III	IV	V	
Säugling A	10	1	—	5	4	Schafblutagar L-Agar, TS-Agar
Säugling B	12	—	12	—	—	Schafblutagar Frauenmilchagar L-Agar
Säugling C	16	—	16	—	—	Frauenmilchagar Schafblutagar TS-Agar, L-Agar B-Agar
Säugling D	16	—	16	—	—	Frauenmilchagar Schafblutagar L-Agar, B-Agar
Säugling E	9	—	9	—	—	Schafblutagar L-Agar, B-Agar AOAC-Agar
Säugling F	14	—	10	1	3	Frauenmilchagar Schafblutagar L-Agar, B-Agar
	77	1	63	6	7	
Erwachsener A_1	15	7	1	—	7	Schafblutagar Frauenmilchagar L-Agar, B-Agar
Erwachsener A_2	16	—	—	—	16	Schafblutagar Frauenmilchagar LBS-Agar, B-Agar L-Agar
Erwachsener B	14	—	1	—	13	Schafblutagar Frauenmilchagar LBS-Agar, B-Agar L-Agar
Erwachsener C	22 7**	— —	— —	— —	22 7	Schafblutagar Frauenmilchagar LBS-Agar, L-Agar B-Agar, Hackenthal- Bierkowski-Agar
	151	8	65	6	72	

* Erklärung der Abkürzungen siehe Tab. 1.

** Aerobe Erstisolierung in Symbiose mit Colibakterien, anaerobe Subkultur und biochemische Prüfung (siehe Text).

Kriterien bestätigte bei den Stämmen Nr. 1—3 die Diagnose und erwies die Stämme Nr. 4—7 als Bifidusbakterien der Gruppe V.

Bezüglich der makroskopischen und mikroskopischen Bifidusmorphologie konnten die Beobachtungen von Dehnert[6], Lerche u. Reuter[27] u. a. unter gleichen Versuchsbedingungen bestätigt werden. Die von den genannten Autoren angegebenen morphologischen Merkmale der verschiedenen Bifidustypen beruhen vornehmlich auf Erfahrungen mit jeweils einem Nährboden, nämlich Frauenmilchagar[6] und dem Blutagar nach Hackenthal-Bierkowski[27], und sind nur unter Einhaltung der gleichen Versuchsbedingungen ohne Einschränkung gültig. Unter differenten Kulturbedingungen und auf verschiedenen Nährböden zeigten auch Keime des gleichen Biotyps eine ausgesprochene morphologische Variabilität[50]. Der mikroskopische Formenwandel reichte von Stäbchen und granulierten Stäbchen über Blähformen zu keulenförmigen und mehr oder minder verzweigten Gebilden. Dabei erwiesen sich jedoch die mikroskopischen Größenverhältnisse als relativ konstantes Merkmal, vor allem bei Keimen des Biotyps V, die sich durch ihre besondere Größe auszeichneten. Junge Kulturen waren grampositiv; mit zunehmendem Alter verloren die Keime ihre Gramfestigkeit. Die Kolonieform zeigte sich ebenfalls weitgehend von der Zusammensetzung der Nährböden, dem Alter der Kultur sowie dem Grad der Anaerobiose abhängig. So wuchsen z.B. die verschiedenen Bifidustypen auf B-Agar (Brewer's Anaerobic Agar Difco) meistens in relativ kleinen, deutlich gewölbten Kolonien. Umgekehrt ergab nicht selten die mikroskopische und biochemische Prüfung von differenten Kolonien z.B. auf L-Agar (Lactalysate-Agar BBL), daß die gleichen Biotypen vorlagen.

Tabelle 5. *Vergleichende Untersuchungen der von Haenel und Herrmann zugesandten Bifidusstämme aus Erwachsenenstühlen und Vaginalschleim*

zugesandt von	Nr.	Fundort	Bioch. Typ
Haenel	1	E	V
Haenel	2	V	I/II
Haenel	3	E	V
Herrmann	4	E ♂ (28)	V
Herrmann	5	E ♀ (22)	V
Herrmann	6	E ♀ (22)	V
Herrmann	7	E ♀ (51)	V

Erklärung der Abkürzungen: E = Erwachsener; V = Vagina; in () = Lebensalter.

Eine sichere mikroskopische Abgrenzung der Bifidusbakterien von aeroben bzw. mikroaerophilen Lactobacillen war möglich, wenn die letzteren Keime das typische Bild boten, nämlich grampositive, gerade, relativ große, häufig in Ketten gelagerte Stäbe oder lange Fäden. Bei Hochschichtagarkulturen und bei anaeroben Kulturen auf Schafblutagar war die mikroskopische Diagnose manchmal schwierig, weil unter den genannten Bedingungen die mikroaerophilen Lactobacillen meistens als

relativ kleine Stäbchen vorliegen. Außerdem ist die Kolonieform im Hochschichtagar nicht sicher beurteilbar und auf Schafblutagar häufig uncharakteristisch: klein und transparent. In solchen Fällen klärten aerobe und anaerobe Subkulturen mit mikroskopischer Kontrolle und eventuell biochemischer Prüfung die Diagnose. Auf einigen anderen Nährböden jedoch bildeten Bifidusbakterien und mikroaerophile Lactobacillen gut unterscheidbare Kolonieformen aus, so z. B. auf dem Blutagar nach Hackenthal-Bierkowski[21], auf dem Bifidusbakterien meistens in deutlich erhabenen, bräunlichen, manchmal jedoch auch bläulichen Kolonien, andere Lactobacillen meistens in sehr flachen, blauen Kolonien wuchsen.

B. Serologie

Fragestellung

1. Handelt es sich bei den verschiedenen Bifidusbiotypen um biochemische Untergruppen einer serologisch einheitlichen Art bzw. Gattung?

2. Sind diese Bifidusbakterien von anderen Lactobacillen oder Angehörigen anderer Gattungen (z. B. Corynebakterien) mit serologischen Methoden abgrenzbar?

3. Zeichnen sich Möglichkeiten für eine serologische Schnellmethode zur Erkennung von Bifidusbakterien ab?

Methodik

Von den aus Säuglings- bzw. Erwachsenenstuhl isolierten Biotypen I/II, III und V wurden, meist auf L-Agar, insgesamt elf Stämme zwecks Antigengewinnung gezüchtet. Die Kulturen wurden in 0,3%iger Formolkochsalzlösung aufgeschwemmt und zur Ausschaltung der Spontanagglutinabilität bis zur Homogenisierung ultrabeschallt. Die Antigengebrauchsverdünnungen wurden auf das Röhrchen Nr. 3 des Bariumsulfat-Standards nach McFarland eingestellt. Durch intravenöse Immunisierung von Kaninchen wurden mit je einem Antigen der Bifidusbiotypen I/II, III und V Antiseren hergestellt. Zur Immunisierung wurden die Antigene in steigender Dosis (von 1 ml bis 5 ml einer dichten Aufschwemmung = McFarland Nr. 3) 6—7 Wochen lang im Abstand von 8 Tagen verabfolgt.

Von drei aus dem Dünndarminhalt Erwachsener isolierten mikroaerophilen, homofermentativen Lactobacillen-Stämmen (*L. acidophilus, L. casei, L. plantarum*) und drei heterofermentativen Lactobacillen gleicher Herkunft (*L. buchneri* und zwei *L. fermenti*) wurden nach Wachstum auf LBS-Agar in der oben beschriebenen Weise Antigene hergestellt. Mit den Antigenen von *L. acidophilus, L. plantarum* und *L. fermenti* wurden nach dem obigen Immunisierungsschema ebenfalls Kaninchenantiseren gewonnen.

Die sechs Kaninchenantiseren wurden im Agglutinationsversuch mit der Zentrifugiermethode nach Gaehtgens gegen die elf Bifidus- und sechs Lactobacillenantigene sowie gegen Antigene einiger weiterer grampositiver Keimarten, nämlich Enterokokken, Staphylokokken, Listerien und acht Corynebakterienarten, geprüft.

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammenfassend dargestellt.

Die Antiseren gegen die Bifidustypen I/II und III erreichten Titer von 1:4096, während das Antiserum gegen den Biotyp V nur einen Titer von 1:128 aufwies. Die Titer gegen Antigene anderer Stämme des gleichen Biotyps waren in diesen Seren ausnahmslos erheblich niedriger als die

Tabelle 6. *Agglutinationsversuche mit drei Bifidus- und drei Lactobacillenseren* (reziproke Titerwerte)

Antigen	Antiserum gegen: L. bifidus, Typ I/II S	L. bifidus, Typ III S	L. bifidus, Typ V E	L. acidophilus D	L. plantarum D	L. fermenti D	Herkunft
L. bifidus, Typ I/II	**4096**	128	—	—	—	4	S
L. bifidus, Typ I/II	128	64	—	—	—	4	E
L. bifidus, Typ III	n.d.	**4096**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	S
L. bifidus, Typ III	n.d.	64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	S
L. bifidus, Typ III	n.d.	32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	S
L. bifidus, Typ V	—	n.d.	**128**	—	—	—	E
L. bifidus, Typ V	—	256	32	—	—	—	E
L. bifidus, Typ V	—	n.d.	—	n.d.	n.d.	n.d.	E
L. bifidus, Typ V	—	n.d.	—	n.d.	n.d.	n.d.	E
L. bifidus, Typ V	—	n.d.	—	n.d.	n.d.	n.d.	E
L. bifidus, Typ V	—	n.d.	—	n.d.	n.d.	n.d.	E
L. acidophilus	32	n.d.	8	**33000**	1024	32	D
L. casei	4	32	4	256	16	32	D
L. plantarum	8	—	8	512	**8192**	16	D
L. buchneri	—	128	4	128	32	64	D
L. fermenti	n.d.	32	n.d.	—	8	n.d.	D
L. fermenti	16	—	64	128	64	**8192**	D
S. faecalis	—	64	—	—	—	—	
S. aureus SG 511	8	—	—	64	32	4	
Listeria monocytogenes Typ 1	4	32	8	—	8	4	
C. diphtheriae, Typ gravis	—	8	—	—	—	—	
C. diphtheriae, Typ mitis	—	—	—	—	—	4	
C. diphtheriae, Typ intermedius	16	32	—	—	—	4	
C. equi	—	8	—	—	—	—	
C. xerosis	—	4	—	—	—	—	
C. pyogenes	—	—	—	—	—	—	
C. hofmannii	—	—	—	—	—	—	
C. kutscheri	8	16	—	—	4	4	

Erklärung der Abkürzungen. n.d. = nicht durchgeführt; D = aus Dünndarminhalt; E = aus Erwachsenenstuhl; S = aus Säuglingsstuhl.

homologen Titer (nur 1:32 bis 1:128). Das Typ III-Antiserum zeigte sogar gegen Typ V-Antigen und gegen Typ I/II-Antigen höhere Titer (1:256 und 1:128) als gegen die beiden anderen Antigene des Biotyps III (1:32 und 1:64). Typ I/II-Antiserum und Typ V-Antiserum zeigten demgegenüber keine Kreuzreaktionen mit Antigenen der anderen Biotypen.

Die Bifidusantiseren reagierten mit den Antigenen aerober Lactobacillen in höheren Verdünnungen als mit den Antigenen der anderen grampositiven Keime. Die jeweils stärksten Mitreaktionen zeigte das Typ III-Antiserum gegen *L. buchneri*-Antigen mit einem Titer von 1:128 und gegen das Enterokokkenantigen mit einem Titer von 1:64. Dieses Antiserum zeigte außerdem Mitreaktionen gegen fünf Corynebakterienarten (höchster Titer 1:32 gegen Antigen von *C. diphtheriae*, Typ intermedius). Das Typ I/II-Antiserum wies Mitreaktionen gegen *C. kutscheri* (1:8) und *C. diphtheriae*, Typ intermedius, (1:16) auf, während das Typ V-Antiserum nicht mit Corynebakterienarten reagierte.

Die drei mit Antigenen aerober Lactobacillen hergestellten Antiseren wiesen gegen das homologe Antigen Titer von 1:8192 (*L. plantarum* und *L. fermenti*) und 1:33000 *(L. acidophilus)* auf. Bei dem *L. acidophilus*-Antiserum und bei dem *L. plantarum*-Antiserum traten stärkere Mitreaktionen (bis 1:1024) in Anwesenheit heterologer Antigene von homofermentativen Lactobacillen auf. Die Mitreaktionen in Anwesenheit von Antigenen heterofermentativer Lactobacillen waren deutlich schwächer. Umgekehrt reagierte das *L. fermenti*-Antiserum nur bis zu Titern von höchstens 1:32 mit den Antigenen von homofermentativen Lactobacillen.

Gegen Bifidusantigene fand sich nur im *L. fermenti*-Antiserum eine geringe Mitreaktion, und zwar gegen Antigen vom Biotyp I/II bis zu einem Titer von 1:4. Mit Ausnahme der Agglutination von *S. aureus*-Antigen im *L. acidophilus*- bzw. im *L. plantarum*-Antiserum bis zu Titern von 1:64 und 1:32 zeigten die übrigen grampositiven Keime keine nennenswerten Reaktionen.

Besprechung

Im Zusammenhang mit der quantitativen und qualitativen Stuhlanalyse unter besonderer Berücksichtigung der Bifidusbakterien tauchen zunächst eine Reihe *methodischer Fragen* auf.

Wegen grundlegender methodischer Mängel gilt zunächst die Verwertbarkeit quantitativer Züchtungsergebnisse für Darmkeime noch nicht als hinreichend gesichert[37,41,42]. Neben dem wechselnden Anteil jeweils vermehrungsfähiger Keime sollen besonders die unterschiedliche Leistungsfähigkeit der Nährböden und Kulturmethoden sowie der Verdünnungsfehler für die Diskrepanz zwischen Züchtungsergebnissen und den in der Zählkammer ermittelten Keimzahlen verantwortlich sein[37,41,42]. Diesen methodischen Problemen wurde im Rahmen der vorliegenden

Untersuchungen besonders bei der Bifiduszüchtung Beachtung geschenkt; die Ergebnisse sollen daher am Beispiel dieser Keimgruppe erörtert werden.

Durch die parallele Verwendung jeweils mehrerer zur Bifiduszüchtung brauchbarer Nährböden im Oberflächentropfverfahren unter gleichen Kulturbedingungen, d. h. im Brewerschen Anaerobiergefäß, ließ sich zeigen, daß *der in weiten Grenzen variierenden Nährbodenzusammensetzung meistens kein wesentlicher Einfluß auf das quantitative Züchtungsergebnis zukommt*; denn die kulturellen Keimzahlen für Bifidusbakterien lagen auf den verschiedenen Nährböden fast stets innerhalb enger, vergleichbarer Größenordnungen. Als fast gleichermaßen brauchbar und leistungsfähig erwiesen sich neben dem bereits in der Literatur zur Bifiduszüchtung empfohlenen Schafblutagar[6], dem Frauenmilchagar[6] und dem Blutagar nach Hackenthal-Bierkowski[27] der Lactalysate-Agar BBL (L-Agar) sowie der Brewersche Anaerobic Agar Difco (B-Agar). Der von uns verwendete Tomatensaftagar hat sich nicht immer erwartungsgemäß bewährt. Der LBS-Agar scheint hingegen mehr für die Züchtung aerober Lactobacillen als für die Züchtung strikter Anaerobier geeignet zu sein.

Von größerer Bedeutung als die Zusammensetzung der Nährböden ist für die quantitative Züchtung der strikt anaeroben Bifidusbakterien eine *optimale anaerobe Kulturmethode*[6–10,27,50]. Die Leistungsfähigkeit des bei uns schon seit Jahren für die anaerobe Oberflächenkultur benutzten Brewer-Verfahrens[50] wurde durch parallele Verwendung der Hochschichtkultur, die seit den Untersuchungen Haenels und seiner Mitarb.[14–18] erhebliche Bedeutung erlangt hat, kontrolliert. Dabei lagen die Züchtungsergebnisse für Bifidusbakterien unter den beiden Kulturbedingungen ebenfalls innerhalb derselben oder nah verwandten Größenordnungen, wodurch die Gleichwertigkeit beider Verfahren für die quantitative Bifiduszüchtung gesichert erscheint. Trotzdem möchten wir der anaeroben Oberflächenkultur wegen der besseren Beurteilung der Kolonieform und der erleichterten Reinzüchtung den Vorzug geben.

Das *Ausmaß der Fehlerquelle* bei der Herstellung und Verimpfung höherer Stuhlverdünnungen *(= Verdünnungsfehler*[41]*)* sollte durch die parallele Untersuchung von jeweils zwei um das tausendfache verschiedenen Volumina der entsprechenden Stuhlverdünnungen sichtbar werden. Erwartungsgemäß lagen die vergleichbaren, weil auszählbaren, Verdünnungen im Membranfilterverfahren (mit Untersuchung von je 100 ml der Stuhlverdünnung) um drei Zehnerpotenzen höher als bei der Oberflächentropfmethode (mit Verimpfung von je 0,1 ml der Stuhlverdünnung). Ein Vergleich der Ergebnisse im Membranfilterverfahren mit den Ergebnissen in der Hochschicht- und Oberflächenkultur zeigt, *daß der vermutete Verdünnungsfehler offenbar nur gering ist und nicht überschätzt werden sollte.*

Mit Hinblick auf die eingangs gestellten methodischen Fragen über den Einfluß der Nährbodenzusammensetzung, der Kulturmethoden und des Verdünnungsfehlers auf die quantitativen Züchtungsergebnisse dürfte sich somit bei den vorliegenden Untersuchungen für die Keime der Bifidusgruppe ergeben, daß durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer leistungsfähiger Nährböden und Kulturverfahren sowie zweier Verdünnungsmethoden ein *Züchtungsergebnis* erzielt werden kann, das mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit *den wirklichen Verhältnissen entspricht.*

Die quantitative Züchtungsmethodik der übrigen Darmkeime, die ähnliche Probleme aufwirft, mußte aus äußeren Gründen auf das Oberflächentropfverfahren und einen bis fünf Nährböden pro Keimgruppe beschränkt bleiben. Einige diesbezügliche methodische Fragen sollen im Zusammenhang mit den einzelnen Keimgruppen abgehandelt werden.

Zum *Bifiduskeimanteil* und seinen Relationen zu den übrigen Darmkeimgruppen ist folgendes auszuführen:

Die kulturell ermittelten Bifiduskeimzahlen in den sechs Säuglingsstühlen lagen mit $n \cdot 10^9$ bis $n \cdot 10^{10}$ pro Gramm in ähnlichen Größenordnungen wie bei den Untersuchungen von Petuely u. a.[36,38,43]. Obwohl diese Stuhlproben von ausschließlich brustmilchernährten Säuglingen stammten, fanden sich durchweg beachtliche Colianteile (vgl.[48]). Fast ebenso regelmäßig wurden apathogene Staphylokokken in beträchtlichen Mengen nachgewiesen. In zwei Brustkindstühlen wurden auch aerobe Lactobacillen in Mengen von 500 bzw. 300 Millionen pro Gramm gezüchtet. In Übereinstimmung mit allen bisherigen Befunden[20,36–44,50] konnten gramnegative Anaerobier (*Bacteroides*-Gruppe) in den Brustkindstühlen in Verdünnungen von $1:10^5$ und höher nicht nachgewiesen werden. Die kulturellen Keimzahlrelationen zwischen Bifidusbakterien und den übrigen Darmkeimen erreichten nur einmal den extremen Wert von 300:1. In den anderen fünf Stuhlproben überwog der Bifiduskeimanteil die sonstigen Darmkeime nur um das Doppelte bis Zehnfache. Dadurch wird erneut eine früher getroffene Feststellung[49] bestätigt, daß von einem „reinen" Bifidusstuhl nur ausnahmsweise gesprochen werden kann.

In den vier Erwachsenenstühlen fanden sich Bifidusbakterien in Mengen von $n \cdot 10^8$ bis $n \cdot 10^9$ pro Gramm. Durch diesen Nachweis einer quantitativ bedeutsamen Bifidusflora in Erwachsenenstühlen läßt sich auch unsererseits die Ansicht Haenels[14–18] stützen, allerdings nicht in vollem Umfang; denn es ist nicht so, daß diese Keimgruppe beim Erwachsenen normalerweise stets vorherrscht. Auf Grund der bisherigen eigenen Erfahrungen scheint der Bifidusanteil im Erwachsenenstuhl auch fehlen oder quantitativ unbedeutend ($<10^5$ pro Gramm) sein zu können. Weiterhin bestehen Anhaltspunkte dafür, daß die Bifidusflora nicht nur quantitativ, sondern auch in der qualitativen Zusammensetzung unterschiedlich ist und erheblichen Schwankungen unterliegt (vgl. weiter

unten). Angaben über Bifiduskeimzahlen in Erwachsenenstühlen, die auf der Auszählung aller anaerob in der Hochschichtkultur gewachsenen grampositiven, sorbinsäuretoleranten Stäbchen beruhen[14–18], sind nur mit Vorbehalt verwertbar, weil eine exakte Bifidusdiagnostik eine recht aufwendige morphologische, biochemische — und vielleicht in Zukunft serologische — Methodik erfordert. Bei einer solchen Einordnung aller anaerob gezüchteten grampositiven Stäbchen in die Bifidusgruppe bilden vor allem mikroaerophile, im Sinne der Systematik jedoch aerobe Lactobacillen eine nicht zu unterschätzende Fehlerquelle. So wuchsen z. B. die in Tab. 3 als aerobe Lactobacillen bezeichneten Keime fast ausschließlich nur anaerob an, erwiesen sich jedoch bei Subkultur und näherer Differenzierung als mikroaerophile Aerobier.

Der Wert einer orientierenden Einordnung in Keimgruppen, die zunehmend auch anderenorts angewandt wird[13], sei nicht bestritten. Bevor hinreichende Möglichkeiten zur sicheren Abgrenzung anaerober Bifidusbakterien von mikroaerophilen Lactobacillen bestanden, ordneten wir z. B. anaerob gewachsene Lactobacillen in eine „Acidophilus-Bifidus-Gruppe" ein[48,49]. Inzwischen kann nicht nur der Bifiduskeimanteil differenziert werden; vielmehr hat sich durch die Untersuchungen vor allem von Lerche u. Reuter[26] auch gezeigt, daß der aerobe Lactobacillenanteil der Darmflora nicht nur von *L. acidophilus* gebildet wird. Eigene Versuche an Dünndarminhalt mittels einer Darmkapsel, über die noch gesondert berichtet werden soll, erbrachten durch biochemische Prüfung von 59 Abimpfungen aus 8 Dünndarmproben und den 8 vergleichsweise entnommenen Stuhlproben 6 verschiedene Lactobacillenarten, und zwar neben *L. acidophilus* und *L. salivarius* vor allem *L. casei* und *L. plantarum* sowie die heterofermentativen Arten *L. buchneri* und *L. fermenti*.

Als zahlenmäßig ebenfalls bedeutsame Keimgruppe in Erwachsenenstühlen werden seit einigen Jahren zunehmend die *gramnegativen Anaerobier* herausgestellt[19,48–50,53]. Bei drei der vorliegenden Erwachsenenstuhlanalysen wurden strikt anaerobe gramnegative Stäbchen der *Bacteroides*-Gruppe und verwandter Arten nachgewiesen. Nur bei einer Stuhlprobe fanden sich in den verimpften Verdünnungen keine gramnegativen Anaerobier, d. h. es waren weniger als 10^5 pro Gramm vorhanden. Es bleibe dahingestellt, ob dieses negative Ergebnis durch methodische Mängel, z. B. durch die alleinige Verwendung der anaeroben Blutagarkultur, bedingt ist. Wahrscheinlicher ist, daß ein quantitativ überwiegender Bifiduskeimanteil ein gewisses Gegengewicht gegen die gramnegativen Anaerobier als Hauptbestandteil der „Fäulnisflora" darstellt.

Die wechselnden Anteile an apathogenen Staphylokokken, Streptokokken und auch an Hefen in den vier Erwachsenenstühlen zeigen in Bestätigung früherer eigener Befunde[48–50] erneut die weite Schwankungsbreite der „normalen" Keimzusammensetzung.

Bei den gramnegativen Aerobiern verdient besondere Beachtung, daß bei 7 von 10 Stuhlanalysen die *Coliausbeute auf der anaeroben Schafblutagarkultur um eine Zehnerpotenz höher war als bei aerober Bebrütung*

auf Endo- bzw. MacConkey-Agar. Letzteres Verfahren ist also offenbar nicht optimal. Quantitativ rücken jedoch durch diese Befunde die Colibakterien *nicht* etwa erneut in den Vordergrund, denn nach wie vor liegt der Colianteil um 1—2 Zehnerpotenzen niedriger als der der meist vorherrschenden grampositiven und gramnegativen Anaerobier.

Über die quantitative Erfassung der wichtigsten Keimgruppen hinausgehende *qualitative Untersuchungen* wurden vor allem dem Bifiduskeimanteil gewidmet.

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei diesen Keimen jeweils um eine einheitliche Population oder um Gemische verschiedener Biotypen bzw. Arten handelt, wurden 151 reingezüchtete Bifidusabimpfungen biochemisch und vergleichend morphologisch kontrolliert. Dabei ergab sich in vier Säuglingsstühlen eine Monokultur des Biotyps III nach Dehnert und in zwei Erwachsenenstühlen eine solche des Biotyps V. Da die geprüften Reinkulturen von jeweils 3—6 verschiedenen, zur Erstisolierung benutzten Nährböden stammten, dürfte der kulturell-biochemische Nachweis einer Monokultur mit großer Wahrscheinlichkeit den wirklichen Verhältnissen entsprechen. In je zwei weiteren Säuglings- und Erwachsenenstühlen wurde dreimal ein Gemisch von drei und einmal ein solches von zwei verschiedenen Biotypen festgestellt, wobei aber jeweils ein Biotyp anteilmäßig überwog, und zwar in den Säuglingsstühlen je einmal der Typ IV und III und in den beiden Erwachsenenstühlen der Typ V.

Abweichend von den Befunden Dehnerts[6,7], der aus Brustkindstühlen vornehmlich den Typ IV isolierte, überwog in unserem Untersuchungsgut der Typ III mit 82% der geprüften Abimpfungen aus Säuglingsstühlen. In diesem Zusammenhang sei nochmals hervorgehoben, daß es sich dabei ausschließlich um die Stuhlproben von Brustkindern handelte und die Säuglinge nicht etwa mit sterilisierter Frauenmilch ernährt wurden oder eine Zukost erhielten.

In den Erwachsenenstühlen überwog der Typ V mit fast 88% der geprüften Abimpfungen. Der *Biotyp IV fand sich bisher beim Erwachsenen nicht*[6,7,27] *und kann daher bis auf weiteres als für den Brustkindstuhl typisch angesehen werden*[6,7]. Die Bifidusflora des Erwachsenenstuhls ist nicht konstant. Die qualitativen Schwankungen der Zusammensetzung des Bifiduskeimanteils werden durch die im Abstand von etwa 3 Wochen durchgeführten Stuhlanalysen A_1 und A_2 demonstriert, bei denen zunächst ein Gemisch der Bifidusbiotypen I/II, III und V, später dagegen eine Monokultur des Biotyps V vorlag. Analoge Beobachtungen über die wechselnde Zusammensetzung der Coliflora sind ja seit langem geläufig[21,47].

Zur makroskopischen und mikroskopischen Morphologie der verschiedenen Biotypen des *L. bifidus* sei auf die Ausführungen im Abschnitt

„Ergebnisse" verwiesen. Wie daraus erhellt, bedarf die Frage der morphologischen Differentialdiagnose weiterer Prüfung.

Eine besondere Selektivität der acht benutzten Bifidusnährböden für bestimmte Biotypen des *L. bifidus* ist angesichts der aus sechs Stuhlproben unter Übereinstimmung der qualitativen, d. h. kulturell-biochemischen, und quantitativen Ergebnisse festgestellten Monokulturen wenig wahrscheinlich. Es dürfte daher möglich sein, auch bei Verwendung nur eines zur Bifiduszüchtung brauchbaren Nährbodens ein hinreichend genaues Bild über die Zusammensetzung der grampositiven Anaerobier in einer Stuhlprobe zu gewinnen (vgl. hingegen[10a]).

In der einschlägigen Literatur wird die Schwierigkeit der Reinzüchtung von Bifidusbakterien hervorgehoben[2,3,6]. Dabei soll weniger die Eliminierung von Colibakterien und Kokken als die Trennung von mikroaerophilen stäbchenförmigen Lactobacillen und vor allem von morphologisch und biochemisch differenten Bifidusbakterien eine Rolle spielen. Wir sahen uns dieser Schwierigkeit wohl vor allem deswegen weniger ausgesetzt, weil wir die zur biochemischen Testung bestimmten Abimpfungen nicht von einem unverdünnten Stuhlausstrich, sondern nur von den in höheren Stuhlverdünnungen gewachsenen Einzelkolonien gewannen. Mikroskopische Kontrolle, Katalaseprobe, fehlende Gasbildung und die Übereinstimmung der biochemischen Ergebnisse waren die Hauptkriterien für das Vorliegen einer Reinkultur.

In Übereinstimmung mit neueren kritischen Untersuchungen[6,27] war eine langsame *Adaptation von Bifidusbakterien an aerobe Verhältnisse niemals festzustellen.* Bifidusbakterien verhalten sich also unter Laboratoriumsbedingungen, d. h. vor allem in Reinkultur, als *strikte Anaerobier.* Entsprechend dem der Anaerobiose zugrunde liegenden biochemischen Mechanismus, der in einer Erniedrigung des Redoxpotentials besteht[29,30], wachsen allerdings Bifidusbakterien unter Zusatz stark reduzierender Substanzen, z. B. Ascorbinsäure, auch bei *aerober* Bebrütung. Eine andere Form der Anaerobiose dürfte vorliegen, wenn Bifidusbakterien inmitten von aeroben Colikolonien, somit in sauerstoffarmem, vielleicht sauerstofffreiem Milieu, anwachsen. Die Reinzüchtung solcher Bifidusbakterien aus aerober Colisymbiose gelang nur unter strikt anaeroben Bedingungen.

Bei hinreichender Anaerobiose scheinen die Wuchsstoffbedürfnisse der Bifidusbakterien nicht sehr ausgeprägt zu sein. So ließ sich bei der biochemischen Untersuchung regelmäßig reichliches Wachstum von Bifidusbakterien in einer einfachen 1%igen Kohlenhydratbouillon erzielen, wenn diese kurz vor der Beimpfung erhitzt und anschließend schnell abgekühlt worden war und nach der Beimpfung mit hitzeverflüssigtem, rasch erstarrendem Paraffin luftdicht überschichtet wurde. Gegenüber der komplizierten Zusammensetzung und mühsamen Herstellung z. B. des flüssigen Tomarelli-Mediums[6] dürfte die Züchtung in

1%iger Kohlenhydratbouillon eine wesentliche Vereinfachung bedeuten. Eine etwaige Verunreinigung mit Gasbildnern (E. coli und andere) wird durch Hochtreiben der Paraffinschicht angezeigt.

Zur Frage, ob es sich bei den aus Säuglings- und Erwachsenenstühlen gezüchteten Bifidustypen um Keime der gleichen Art handelt, sind außer den Ergebnissen der vorstehenden quantitativen und qualitativen Stuhlanalysen auch die vergleichenden Untersuchungen an den von Haenel und Herrmann freundlicherweise überlassenen Stämmen verwertbar. Auf Grund der — unseres Erachtens allerdings nur relativ beweiskräftigen — keimmorphologischen und der gut vergleichbaren biochemischen Kriterien sind die aus Erwachsenenstühlen und aus der Vagina isolierten Stämme des Typs I/II, III und V als mit den entsprechenden Säuglingsbiotypen identisch zu betrachten. Der Biotyp IV ist demgegenüber bisher anscheinend nur aus Brustkindstühlen isoliert worden.

Weitere Anhaltspunkte zur Klärung dieser Frage sollten die vorerst orientierenden serologischen Versuche vermitteln.

Serologische Kontrollen an aeroben bzw. mikroaerophilen Lactobacillen und den strikt anaeroben Bifidusbakterien sind von einer Reihe von Untersuchern durchgeführt worden[2,3,6,7,30a,43,52,55]. Dehnert[6,7] hat mit einer Anzahl von selbst hergestellten Seren seiner verschiedenen Biotypen gezeigt, daß diese serologisch voneinander abgetrennt werden können. Unabhängig davon haben Petuely u. Lindner[43] mittels fluorescierender Bifidusantikörper den Nachweis erbracht, daß die im Stuhlausstrich vorhandenen Bifiduskeime mit den in der Kultur gezüchteten qualitativ und quantitativ identisch waren.

Unsere eigenen Versuche sollten zunächst Aufschluß darüber geben, ob innerhalb der geprüften Bifidusbiotypen — ein Antigen des Biotyps IV stand leider nicht zur Verfügung — eine gewisse serologische Einheitlichkeit besteht. Die bisherigen Ergebnisse deuten nun in Erweiterung der Befunde Dehnerts auf eine beachtliche serologische Vielgestaltigkeit der Bifidusgruppe hin, und zwar sind die Biotypen I/II, III und V offenbar nicht nur voneinander serologisch abgrenzbar, vielmehr sind allem Anschein nach auch innerhalb des gleichen Biotyps deutliche Antigenunterschiede vorhanden. Möglicherweise lassen sich die Biotypen nochmals in Serotypen aufgliedern, wie es umgekehrt aber auch noch nicht sicher ausgeschlossen ist, daß der gleiche Serotyp verschiedene Biotypen einschließt. Die Klärung dieser Fragen erscheint dringend nötig, erfordert aber die Prüfung einer großen Zahl eindeutig charakterisierter Stämme verschiedenster Provenienz.

Die serologische Vielgestaltigkeit der Bifidusgruppe dürfte die Anwendung fluorescierender Antikörper zum Bifidusnachweis im Stuhlausstrich im Sinne der Untersuchungen von Petuely u. Lindner außerordentlich erschweren, weil man zur Zeit noch keine Vorstellung von der annähernden Zahl der Serotypen hat. Auch an eine serologische Schnellmethode zur Bifidusdiagnostik (z. B. mittels polyvalenter Grup-

penseren und speziell absorbierter Typseren) ist unter diesen Voraussetzungen vorerst noch nicht zu denken.

Hinzu kommt, daß die Bifidusantiseren wechselnd stark auf aerobe bzw. mikroaerophile Lactobacillen, und zwar besonders auf heterofermentative Arten, übergreifen, so daß diese miterfaßt werden. Man müßte also auch hier absorbierte Seren verwenden, um Kreuzreaktionen auszuschalten.

Bei der Serologie der aeroben Lactobacillen sei als Nebenbefund erwähnt, daß die drei Antiseren gegen aerobe Lactobacillen praktisch nicht mit Antigen von *Listeria monocytogenes* reagierten. Früher durchgeführte Agglutinationsversuche mit *L. monocytogenes*-Antiserum und Lactobacillenantigenen[51] hatten ebenfalls keine Antigengemeinschaften aufgezeigt. Diese Ergebnisse sind insofern bedeutsam, als eine serologische Verwandtschaft dieser Keime durch die Befunde Lodenkämpers[30a] an Acidobakterien (= Lactobacillen) und einem von uns als *Listeria* betrachteten „pathogenen Acidobakterienstamm“[30a,51] wahrscheinlich geworden war.

Serologische Anhaltspunkte für die, vor allem auf Grund morphologischer Ähnlichkeiten vermutete Verwandtschaft zwischen Bifiduskeimen und Corynebakterien[2,3] fanden sich nicht. Nach Slack et al.[52a] ist auch keine Antigengemeinschaft mit *Actinomyces*-Keimen anzunehmen.

Andererseits sprechen auch unsere orientierenden serologischen Versuche dafür, daß Bifidusbakterien entgegen der jetzigen taxonomischen Einordnung nicht in die gleiche Gattung wie die aeroben bzw. mikroaerophilen Lactobacillen gehören. Zu der gleichen Ansicht kommen Rogosa u. Sharpe[46] auf Grund kritischer Studien an aeroben Lactobacillen. Die Untersuchungsergebnisse Dehnerts u. a. an Bifidusbakterien[1–3,5–10,36–44] sowie die Zellwandanalysen von Cummins u. Glendenning[4a] weisen in die gleiche Richtung. Folgerichtig sprechen Beerens u.a.[1] sowie Manciaux[32] bereits vom *Bifidibacterium bifidum*. In letzterer Arbeit[32] werden allerdings bei der Bemühung um eine differentialdiagnostische Abgrenzung gegen aerobe Lactobacillen *L. acidophilus*-Keime als nitratase- und katalasepositiv bezeichnet, was mit unseren Beobachtungen nicht übereinstimmt. Vielmehr ist das Fehlen von Katalase, Gelatinase und Nitratase sowie der Beweglichkeit, der Indolbildung und anderer Eigenschaften sowohl Bifidusbakterien als auch aeroben Lactobacillen gemeinsam[1–3,5–10,26,27]. Neben den serologischen und zellwandanalytischen Unterschieden stellen die verschiedene Morphologie und die strikte Anaerobiose der Bifidusbakterien wesentliche Merkmale dar, die zur Gattungstrennung herangezogen werden sollten. Die Frage der taxonomischen Einordnung der Bifidusbakterien dürfte somit im Lichte dieser Erkenntnisse zu revidieren sein.

Zusammenfassung

Bei der bakteriologischen Analyse von sechs Brustkind- und vier Erwachsenenstühlen wurde der Einfluß der Nährbodenzusammensetzung, der Kulturmethode und des Verdünnungsverfahrens auf das

quantitative Züchtungsergebnis besonders des Bifiduskeimanteils durch parallele Verwendung von acht Bifidusnährböden und jeweils zwei Kultur- und Verdünnungsmethoden untersucht. Aus den Brustkindstühlen wurden Bifidusbakterien in Mengen bis zu $n \cdot 10^{10}$ pro Gramm und in den Erwachsenenstühlen in Mengen bis zu $n \cdot 10^{9}$ pro Gramm gezüchtet. Die Relationen zwischen Bifiduskeimanteil und den übrigen Darmkeimgruppen werden erörtert.

Die morphologische und kulturell-biochemische Analyse von 151 reingezüchteten Bifidusabimpfungen ergab in vier Brustkindstühlen eine Monokultur des Biotyps III nach Dehnert und in zwei Erwachsenenstühlen eine Monokultur des Biotyps V. In den vier restlichen Stuhlproben wurde ein Gemisch von 2—3 Biotypen festgestellt. Der Biotyp IV fand sich in den Erwachsenenstühlen nicht. Eine besondere Selektivität der acht benutzten Bifidusnährböden für bestimmte Biotypen des *L. bifidus* konnte nicht festgestellt werden.

Bei Agglutinationsversuchen mit drei Bifidusantiseren und drei Antiseren gegen aerobe Lactobacillen ergab sich eine beachtliche serologische Vielgestaltigkeit der Bifidusgruppe, die weitere Untersuchungen nötig erscheinen läßt. Abschließend wird die Frage der taxonomischen Stellung von Bifidusbakterien und aeroben bzw. mikroaerophilen Lactobacillen besprochen.

Frau M. Kalff und Fräulein M. Loy danken wir für unermüdliche technische Assistenz.

Literatur

[1] Beerens, H., A. Gérard et J. Guillaume: Étude de 30 souches de Bifidibacterium bifidum (Lactobacillus bifidus) — Caractérisation d'une variété buccale — Comparaison avec les souches d'origine fécale. Ann. Inst. Pasteur Lille **9**, 77—85 (1957).

[2] Boventer, K.: Untersuchungen über das Bacterium bifidum. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **142**, 419—430 (1938).

[3] Boventer, K.: Bacterium bifidum und seine Bedeutung. Ergebn. Hyg. Bakt. **26**, 193—234 (1949).

[4] Braun, O. H.: Untersuchungen mit Polysaccharidfraktionen aus Bifidusbakterien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **173**, 563—567 (1958).

[4a] Cummins, C. S., and O. M. Glendenning: Composition of the cellwall of Lactobacillus bifidus. Nature (Lond.) **180**, 337 (1957).

[5] Dehnert, J.: Untersuchung über die grampositive Stuhlflora des Brustmilchkindes. I. Mitteilung, Literaturübersicht. Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **163**, 481—489 (1957).

[6] Dehnert, J.: Untersuchung über die grampositive Stuhlflora des Brustmilchkindes. II. Mitteilung. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **169**, 66—83 (1957).

[7] Dehnert, J.: Serologische Untersuchungen zur Identifizierung der Stuhlkeime frauenmilchgenährter Kinder. Ann. paediat. (Basel) **192**, 195—213 (1959).

[8] Dehnert, J.: Von der Wirkung der Frauenmilchernährung. Z. Kinderheilk. **83**, 332—340 (1960).

[9] Dehnert, J.: Von der Wirkung der Frauenmilchernährung. (Diskussion der Bemerkung von H. Haenel). Z. Kinderheilk. **84**, 319—326 (1960).

[10] Dehnert, J.: Betrachtungen zum Bifidumproblem. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **179**, 490—498 (1960).

[10a] Dehnert, J.: Zur normalen Intestinalbesiedlung. Grenzen der kulturellen Analyse der Stuhlflora. Wien. klin. Wschr. **73**, 729—733 (1961).

[11] Frisell, E.: Studies on Bacterium bifidum in healthy infants. Acta paediat. (Uppsala) **40**, Suppl. 80 (1951).

[12] Gyllenberg, H., and G. Carlberg: The dominance of a specific nutritional type of Lactobacillus bifidus in breast-fed infants. Acta path. microbiol. scand. **42**, 380—384 (1958).

[13] Gyllenberg, H., and P. Roine: The value of colony counts in evaluating the abundance of Lactobacillus bifidus in infant faeces. Acta path. microbiol. scand. **41**, 144—150 (1957).

[14] Haenel, H.: Über das Vorkommen von anaeroben Lactobacillen bei Säuglingen und Erwachsenen. Z. Kinderheilk. **78**, 592—596 (1956).

[15] Haenel, H.: Experimentelle Untersuchungen über die Zusammensetzung der Darmflora. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **170**, 323—326 (1957).

[16] Haenel, H.: Von der Wirkung der Frauenmilchnahrung. (Eine Stellungnahme zu der Arbeit von J. Dehnert). Z. Kinderheilk. **84**, 314—318 (1960).

[17] Haenel, H., u. G. Feldheim: Über den Einfluß des Abstillens auf die fäkale Flora des Säuglings. Arch. Kinderheilk. **157**, 226—234 (1958).

[18] Haenel, H., W. Feldheim, W. Müller-Beuthow u. H. Ruttloff: Versuche zur Umstimmung der fäkalen Flora des gesunden Erwachsenen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **173**, 76—96 (1958).

[19] Herrmann, W.: Die anaeroben Darmbakterien im Rahmen der Dysbakterie-Frage. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **170**, 316—323 (1957).

[20] Hoffmann, K., u. H. U. Sauerbrei: Über die Stuhlflora von Frühgeborenen im Klinikmilieu bei Ernährung mit roher und gekochter Frauenmilch. Z. Kinderheilk. **81**, 367—378 (1958).

[21] Kauffmann, F., u. B. Perch: Über die Coliflora des gesunden Menschen. Acta path. microbiol. scand. **20**, 201—220 (1943).

[22] Kludas, M.: Züchtung von Laktobazillus bifidus in und auf einfachen Nährmedien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **174**, 71—74 (1959).

[23] Kludas, M., u. H. Dobberstein: Zur Morphologie von L. bifidus und anderen Laktobazillen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **175**, 520—528 (1959).

[24] Lauter, L.: Über das Vorkommen des Bacillus bifidus beim Neugeborenen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **86**, 579—582 (1921).

[25] Lavergne, E. de: La flore bifide du nourisson au sein. Les facteurs bifidigènes. Ann. Inst. Pasteur Lille **10**, 1—8 (1958/59).

[26] Lerche, M., u. G. Reuter: Beitrag zur Methodik der Isolierung und Differenzierung von aerob wachsenden „Laktobazillen". (Genus „Lactobacillus Beijerinck"). Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **179**, 354—370 (1960).

[27] Lerche, M., u. G. Reuter: Isolierung und Differenzierung anaerober Lactobacilleae aus dem Darm erwachsener Menschen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **182**, 324—356 (1961).

[28] Liebscher, S.: Sind die im Darm des mit Muttermilch ernährten Säuglings vorherrschenden Bifidusbakterien als nützliche Vitaminlieferanten für den Säuglingsorganismus anzusehen? Z. Kinderheilk. **85**, 265 (1961).

[29] Linzenmeier, G.: Eine einfache Modifikation des Anaerobenmediums nach Tarozzi. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **170**, 192—194 (1958).

[30] Linzenmeier, G.: Zur Methodik der Anaerobenzüchtung. Über die Eignung des Indikatorprinzips zur Wertbemessung anaerober Nährmedien. I. Mitteilung: Messung des Redoxpotentials unter anaeroben Verhältnissen. II. Mitteilung: Die Reoxydation. Arch. Hyg. (Berl.) **143**, 537—560, 561—586 (1959).

[30a] Lodenkämper, H., u. H. Sondhauss: Differentialdiagnostische Untersuchungen an Milchsäurebakterien verschiedener Herkunft. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **154**, 99—105 (1949).

[31] Mac Gillivray, P. C., H. V. L. Finlay and T. B. Binns: Use of lactulose to create a preponderance of lactobacilli in the intestine of bottle-fed infants. Scot. med. J. **4**, 182 (1959).
[32] Manciaux, M.: Bifidibacterium bifidum, ses facteurs de croissance, essais d'implantation chez le nourisson. Nancy 1958.
[33] Mayer, J. B.: Das Bifidum-Problem. Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. **7**, 429—453 (1956).
[34] Mayer, J. B.: Die symbiontischen Leistungen der physiologischen Darmflora des Kindes. Int. Vitaminforsch. **18**, 101—109 (1957).
[35] Müller, H., u. E. Walch: Untersuchungen über die bifidogene Wirksamkeit des β-Äthyl-N-acetyl-d-glukosaminids in vivo. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **180**, 199—204 (1960).
[36] Petuely, F.: Über das Bifidus-Problem. Münch. med. Wschr. **98**, 263—266 (1956).
[37] Petuely, F.: Ist eine quantitative Erfassung der in Säuglingsstühlen vorhandenen Bifiduskeime durch Züchtung möglich? Z. Kinderheilk. **78**, 28—34 (1956).
[38] Petuely, F.: Über die quantitative Erfassung des Lb. bifidus im Stuhl von Säuglingen. Z. Kinderheilk. **79**, 180—184 (1957).
[39] Petuely, F.: Bifidusflora bei Flaschenkindern durch bifidogene Substanzen (Bifidusfaktor). Z. Kinderheilk. **79**, 174—179 (1957).
[40] Petuely, F.: Der Bifidusfaktor. Dtsch. med. Wschr. **82**, 1957—1960 (1957).
[41] Petuely, F.: Unser Wissen über die Darmflora. Ärztl. Prax. **12**, 2253, 2277, 2278 (1960).
[42] Petuely, F., u. G. Lindner: Kritische Untersuchungen über die Darmflora. I. Die Verschiebung der Keimrelation im gramgefärbten Ausstrich. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **177**, 332—339 (1960).
[43] Petuely, F., u. G. Lindner: Kritische Untersuchungen über die Darmflora. II. Die Methode der quantitativen Analyse mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **177**, 340—352 (1960).
[44] Petuely, F., u. V. Lynau: Ein einfacher, vollsynthetischer Optimalnährboden für den Lactobacillus bifidus. Biochem. Z. **326**, 62—78 (1954).
[45] Rogosa, M., J. A. Mitchell and R. F. Wiseman: A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. J. Bact. **62**, 132 (1951).
[46] Rogosa, M., and M. E. Sharpe: An approach to the classification of the lactobacilli. J. appl. Bact. **22**, 329—340 (1959).
[47] Sears, H. J., J. Brownlee and J. K. Uchiyama: Persistence of individual strains of Escherichia coli in the intestinal tract of man. J. Bact. **59**, 293—301 (1950).
[48] Seeliger, H. P. R.: Das Dysbakterieproblem vom Standpunkt des Mikrobiologen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **170**, 288—316 (1957).
[49] Seeliger, H. P. R.: Probleme der mikrobiellen Besiedlung des Darmtrakts. Dtsch. med. Wschr. **83**, 629—634 (1958).
[50] Seeliger, H. P. R.: Berichte an die Deutsche Forschungsgemeinschaft. 1958, 1959.
[51] Seeliger, H. P. R.: Listeriose. Leipzig: Barth 1958.
[52] Sharpe, M. E.: A serological classification of lactobacilli. J. gen. Microbiol. **12**, 107 (1955).
[52a] Slack, J. M., A. Winger and D. W. Moore jr.: Serological grouping of Actinomyces by means of fluorescent antibodies. J. Bact. **82**, 54—65 (1961).
[53] Smith, W., and W. E. Crabb: The faecal bacterial flora of animals and man: its development in the young. J. Path. Bact. **82**, 53—66 (1961).
[54] Tissier: Recherches sur la flore intestinale des nourissons. Paris 1900.
[55] Williams, N. B., R. F. Norris and P. György: Antigenic and cultural relationships of Lactobacillus bifidus and Lactobacillus parabifidus. J. infect. Dis. **92**, 121—131 (1953).

Prof. Dr. H. P. R. Seeliger, Dr. H. Werner,
Hygiene-Institut der Universität, 53 Bonn/Rhein, Venusberg

Zeitschrift f. Hygiene 148, 405—411 (1962)

Aus dem Institut für Milchhygiene der Bundesversuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel (Direktor: Prof. Dr. M. Seelemann)

Die Streptokokkenflora in den bovinen Tonsillen

Von
G. Obiger

(Eingegangen am 5. Januar 1962)

Die Tonsillen aller Säugetiere kommen infolge ihrer topographischen Lage mit einer Menge von Mikroorganismen in Berührung, die per os oder auf dem Atemwege durch den Schlund in den Körper gelangen, wobei sicher ein Teil an ihrer Oberfläche haftenbleibt. Hierbei dürften die Schleimhautbälge, Falten, Grübchen und Taschen der Mandeln begünstigend auf das Haften der Mikroorganismen einwirken.

Die Mandeln sind als lymphatische Abwehrorgane zu betrachten, die in der Lage sind, die eingedrungenen Keime festzuhalten, aufzusaugen und zu vernichten. Ein Teil der apathogenen oder pathogenen Keime wird unter Umständen die Tonsillen passieren und so in den Blutkreislauf gelangen. Die Tonsillen werden ihre spezielle Abwehrfunktion nur im gesunden, intakten Zustande verrichten können.

Viele Krankheiten des Menschen beginnen oder stehen in Verbindung mit Entzündungen des Rachens, speziell der Tonsillen. Daher gehört es mit zu den Gepflogenheiten des Arztes, bei einer gründlichen Untersuchung von Patienten eine Inspektion des Rachens einschließlich der Mandeln vorzunehmen.

In der Veterinärmedizin liegen die Verhältnisse offenbar etwas anders; denn Erkrankungen der Tonsillen spielen bei den meisten Haustieren zum mindesten klinisch keine Rolle. Eine Ausnahme macht der Hund, bei dem eine Angina vorkommt, die unter Umständen schlecht ausheilt, oder bei dem sich im Verlaufe von Infektionskrankheiten eine chronische Tonsillitis entwickeln kann; auch der Beginn der Hundestaupe wird häufig durch eine Tonsillitis angezeigt.

Bei Großtieren treten solche Krankheitsfälle wohl nicht auf. Oder welcher praktizierende Tierarzt hat schon ein Rind auf Mandelentzündung untersucht und behandelt? Man beschränkt sich in der Veterinärmedizin auf die Untersuchung der Tonsillen bei Schlachttieren und die Erhebung von Schlachtbefunden. Aktinomykose, tuberkulöse Veränderungen, Abscesse, Eiterpfröpfe der Tonsillen werden nur beim geschlachteten Rinde festgestellt.

Über bakteriologische Untersuchungen von bovinen Tonsillen ist nicht viel Literatur bekannt. Über sie wurde in einer früheren Arbeit berichtet[3]. Es scheint so, als ob Streptokokken mit an erster Stelle in der Mikroflora der Tonsillen stehen.

Seelemann[5] gibt die Tonsillen der Rinder als Fundort an für den Sc. dysgalactiae, Sc. uberis, Sc. bovis und Sc. salivarius, worunter er die vergrünende Art verstand, die heute (siehe bei Seelemann u. Obiger[7]) besser als Sc. viridans bezeichnet wird. Obiger[3] fand unter anderem erstmalig in Rindertonsillen zwei Sc. agalactiae-Stämme. Inzwischen hat auch Fornoni[2] Befunde des Sc. agalactiae in Rindertonsillen mitgeteilt. Er konnte aus den Tonsillen von 222 normalen Schlachtrindern achtmal = 3,6% Streptokokken vom Typ des Sc. agalactiae isolieren. Daneben fand er auch zehn Sc. dysgalactiae-Stämme und einmal Sc. uberis. Das Vorkommen der als Mastitiserreger bekannten Streptokokkenarten in den Tonsillen könnte Beachtung erfordern, da die Tonsillen als Eingangspforte für Krankheitserreger anzusehen sind, wenn von hier aus ein Infektionsweg zum Euter nachzuweisen wäre. Dafür sind bisher noch keine Beweise erbracht worden. Da aber in manchen Fällen von Streptokokken-Mastitis der Infektionsmodus unklar ist, könnte man an Zusammenhänge zwischen der Streptokokkenbesiedlung der Tonsillen und der Erkrankung des Euters denken. Solche Vorkommnisse würden die sich häufiger bei der Sanierung galtinfizierter Bestände ergebenden Schwierigkeiten durch immer wieder auftretende Neuinfektionen erklären; denn eine therapeutische Maßnahme zur Vernichtung der Streptokokken in den Tonsillen ist nicht denkbar.

Wir haben in Fortsetzung der früheren Arbeit weitere bakteriologische Untersuchungen von bovinen Tonsillen durchgeführt, um über die Zusammensetzung der Streptokokkenflora, speziell der Mastitis-Streptokokken, Klarheit zu bekommen.

In vorliegender Arbeit werden die bakteriologischen Untersuchungsergebnisse von 124 Tonsillen von 62 Rindern (34 Kühe, 3 Jungrinder, 18 Jungbullen und 7 Kälber) mitgeteilt.

Vier Kühe waren auf ein oder mehreren Vierteln an Galt erkrankt, die übrigen waren normale Schlachttiere, von denen Euterbefunde nicht bekannt geworden sind.

Methodik

Die Entnahme und Verarbeitung der Tonsillen erfolgte wie in der früheren Arbeit angegeben. Die Tonsillen waren in allen Fällen makroskopisch nicht verändert. Damals war jedoch für die Primärkultur eine 0,1%ige Traubenzucker-Agarplatte verwendet worden. Diesmal wurden die Streptokokken mit Hilfe einer 5%igen Kälberblutplatte oder des TKT-Mediums[6] ohne oder mit Anreicherung des Tonsillenmaterials in Pike-Bouillon[1] herausgezüchtet. Bei den anfänglichen Untersuchungen zeigte sich, daß eine Bebrütung in der selektiv-hemmenden Pike-Bouillon vor Beimpfung des festen Nährbodens keine Mehrausbeute an Streptokokken erbrachte, so daß sie später weggelassen wurde. Blutplatte und TKT-Medium erwiesen sich bei fraktioniertem Ausstreichen von Tonsillenmaterial auf dem Agar als gleichwertig. Meist wurden beide Platten für die Anzüchtung verwendet, wobei das TKT-Medium vor die Blutplatte geschaltet wurde.

Von den nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C auf der Blut- oder TKT-Platte angegangenen und als Streptokokken angesehenen Kolonien wurden jeweils bis zu sechs Kolonien in 0,1%ige Traubenzucker-Bouillon abgeimpft. Stellte sich später heraus, daß ein oder mehrere Stämme identisch waren, so wurde nur ein Stamm gerechnet. Die Traubenzucker-Bouillonkultur diente nach mikroskopischer Prüfung auf Streptokokken und Reinheit als Ausgangskultur für die „bunte Reihe". Die

serologische Bestimmung erfolgte meist mit Fuller-, vereinzelt mit Lancefield-Extrakten durch die Präcipitation mit Hilfe von selbst hergestellten gruppenspezifischen Seren.

Ergebnisse

Aus den Tonsillen wurden insgesamt 105 Streptokokkenstämme isoliert und bestimmt, die sich auf die Streptokokkengruppen wie folgt verteilten:

serolog. Gruppe	Art	Anzahl der Stämme	%
B	Sc. agalactiae	3	2,9
C	Sc. pyogenes animalis	11	10,5
	Sc. dysgalactiae	14	13,3
D	Sc. faecium	8	7,6
	Sc. glycerinaceus	6	5,7
E	Sc. uberis	18	17,1
ohne Gruppenantigen	Sc. viridans I	2	1,9
	Sc. viridans II	8	7,6
	Sc. viridans III	1	1,0
	Sc. viridans IV	21	20,0
	Sc. viridans V	6	5,7
	Sc. salivarius	3	2,9
	sonstige nicht bestimmbare Streptokokken	4	3,8
	insgesamt:	105	

Die drei gefundenen *Agalactiae-Stämme* gehörten der atypischen Form an. Die Bouillon war nicht klar, sondern trübe mit flockigem Bodensatz. Die Ketten waren überwiegend kurz, daneben waren Diplokokken und kleine Kokkenhaufen zu sehen. Ein Stamm wuchs noch in Methylenblaumilch 1:20000, ein anderer war gegenüber Methylenblau 1:10000 resistent. Ein solches Verhalten wird nach unseren Erfahrungen bei Gruppe B-Stämmen menschlichen Ursprungs beobachtet. Auf der Blutplatte erwiesen sich die Stämme betahämolysierend, ferner waren sie CAMP-positiv und Natriumhippurat-positiv.

Der *Sc. pyogenes animalis* war die einzige pyogene Art, die in den Tonsillen gefunden wurde. Die Stämme waren in der „bunten Reihe" nicht sehr aktiv, zeigten aber alle das charakteristische Merkmal der Sorbitvergärung.

Die Stämme des *Sc. dysgalactiae* boten in biochemischer Hinsicht keine Besonderheit, jedoch erwies sich ein Stamm entgegen der Regel als Äsculin-positiv. Auf der Blutplatte verhielten sich die Dysgalactiae-Stämme unterschiedlich. Ein Teil verursachte eine Alpha-Hämolyse mit Vergrünung, die Hälfte war indifferent, jedoch kam bei diesen die alphahämolysierende Eigenschaft auf TKT-Agar zum Vorschein.

Die isolierten Enterokokken gehörten zur Art *Sc. faecium* und *Sc. glycerinaceus*. Die Sherman-Kriterien waren bei den Stämmen nicht immer deutlich ausgeprägt. Vier Faecium-Stämme waren nicht resistent gegenüber 6,5% NaCl, fünf Stämme (4mal Sc. faecium, 1mal Sc. glycerinaceus) wuchsen nicht mehr in Methylenblaumilch 1:1000. Die meisten Stämme waren nichthämolytisch, vier Stämme verursachten auf der Blutplatte Hämolysen vom Alphatyp, allerdings ohne Vergrünung oder nur mit einem Grünschimmer; die Kolonien von zwei nichthämolytischen Stämmen waren am Rande leicht aufgehellt. In ihren biochemischen Eigenschaften waren die Faecium- und Glycerinaceus-Stämme bis auf das trennende Merkmal der Glycerinspaltung weitgehend übereinstimmend.

Bezüglich der *Streptokokken der Gruppe E*, kann auf die Arbeiten von Obiger u. Seelemann[4] verwiesen werden, die kürzlich eingehend zum Gruppe E-Uberis-Problem Stellung genommen haben. Die isolierten Stämme dürften mit den von Diernhofer beschriebenen Streptokokken übereinstimmen und daher als *Sc. uberis* anzusehen sein. Ihre Extrakte präcipitierten mit Seren, die aus Lancefields hämolytischen Gruppe E-Stämmen oder aus sogenannten Uberis-Stämmen hergestellt waren; jedes dieser Seren erfaßte beide Streptokokkenarten.

Die isolierten *Sc. viridans-Arten* waren unserer Ansicht nach durchaus als „echte" vergrünende Streptokokken im Sinne Schottmüllers (siehe bei Seelemann u. Obiger) anzusprechen. Die Viridation auf der Blutplatte war meist deutlich ausgeprägt und mit Alpha-Hämolyse verbunden. Nur bei vier Stämmen war die Vergrünung schwach, jedoch trat sie bei Züchtung der Streptokokken auf TKT-Agar stärker hervor. Die TKT-Platte eignet sich besonders gut zur Darstellung der Viridation, die sich als kräftige, grasgrüne Verfärbung des Nährbodens kundtut. Die auf Grund des Raffinose- und Inulin-Spaltungsvermögens sowie der Morphologie getroffene Unterteilung in die Unterarten I—V ergab am häufigsten das Vorkommen des Sc. viridans IV (21 Stämme) und in weiterem Abstande das des Typs II (8 Stämme). Nach unseren Erfahrungen sind diese beiden Viridans-Typen auch bei menschlichen Erkrankungen zu finden.

Die drei *Salivarius-Stämme* waren gekennzeichnet durch ihr mucoides Wachstum auf 5%igem Saccharoseagar. Ihre Extrakte ergaben schwache bzw. ++-Reaktionen mit Gruppe D-Serum. Aus der Literatur (Sherman, Niven u. Smiley[8]) ist bekannt, daß auch einige Bovis-Stämme die Fähigkeit besitzen sollen, aus Saccharose oder Raffinose höhere Polysaccharide zu synthetisieren. Die gefundenen Stämme entsprachen nicht dem Bovistyp. Sie verhielten sich auf der Blutplatte inaktiv (keine Hämolyse, keine Vergrünung), waren auf der TKT-Platte in ihrem

Wachstum gehemmt, wuchsen nicht in 2%iger Kochsalzbouillon, dagegen waren sie resistent gegenüber Methylenblaumilch 1:5000.

Die Stämme wurden zur Kontrolluntersuchung an den Public Health Laboratory Service in Colindale/England geschickt. Dort (Dr. Williams, Schreiben vom 2.1.1959 und 5.1.1959) wurde für zwei Stämme (Stamm 266 und 267) unsere Diagnose Sc. salivarius bestätigt. Stamm 265 wurde, da er mit Gruppe D-Serum reagierte, als Gruppe D-Streptococcus bestimmt, ohne daß allerdings eine genaue Speciesangabe erfolgte. Wegen der Reaktion mit D-Serum war der Stamm nicht auf Levanbildung getestet worden. Williams teilte zu den Differenzierungsergebnissen mit, daß das Verhalten auf gallehaltigem Agar (dehydrierte Ochsengalle, Difco-Präparat) ausschlaggebend war; Sc. salivarius soll niemals auf Galleagar wachsen.

Bei unserer Prüfung haben sich die drei Stämme auf 40%igem Galleagar (hergestellt aus frischer Rindergalle) resistent erwiesen. Wir möchten alle drei Stämme als identisch ansehen, da sie in ihren biochemischen Eigenschaften übereinstimmten; bei allen drei Stämmen wurde auch die Mitreaktion mit Gruppe D-Serum beobachtet. Unserer Meinung nach handelt es sich bei den Stämmen um den echten Sc. salivarius, wobei das Merkmal des schleimigen Wachstums bewußt in den Vordergrund gestellt und die Mitreaktion mit D-Serum ignoriert wird.

Die *nicht bestimmbaren Streptokokken* zeigten kein besonderes Verhalten in der Kohlenhydratreihe, auch waren sie serologisch nicht erfaßbar. Sie waren nichthämolysierend, wuchsen nicht in Methylenblaumilch 1:5000 und in 4%iger Kochsalzbouillon.

Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf Streptokokkenvorkommen in den Rindertonsillen haben zu zahlenmäßig besseren Resultaten geführt als frühere. Bei der Verarbeitung der Tonsillen auf 0,1%igen Traubenzucker-Agarplatten ist sicherlich früher ein Teil der Streptokokken infolge unerwünschter Überwucherung durch Begleitbakterien der Entdeckung entgangen. Neuerdings wurde zur Anzüchtung das TKT-Medium mit nachgeschalteter Blutplatte verwendet. Durch Verwendung des TKT-Mediums wurde der überwiegende Teil unerwünschter Begleitbakterien ausgeschaltet. Die Blutplatte ermöglichte insbesondere die Erkennung von Sc. pyogenes animalis-Stämmen und Viridans-Arten, die durch ihre Hämolyse bzw. Vergrünung auf den bluthaltigen Agarplatten deutlich hervortreten. Die Erkennung der schleimig wachsenden Salivarius-Stämme wurde durch Einschaltung von 5%igen Saccharoseplatten ermöglicht.

Diesmal wurden keine Streptokokken der Gruppe N gefunden, während in der früheren Arbeit keine Viridans-Streptokokken und Sc. pyogenes animalis-Stämme sowie Salivarius-Sämme ermittelt werden konnten. Hinsichtlich der übrigen Streptokokkenarten stimmen die früheren Untersuchungsergebnisse mit den neueren Befunden weit-

gehend überein. Die Ergebnisse zeigen, daß die Streptokokkenbefunde wesentlich von der Verarbeitungs- und Untersuchungstechnik des Tonsillenmaterials und wohl auch vom Zufall abhängen. Es ist auch nicht zu erwarten, daß von Natur aus eine konstante Streptokokkenflora in den Tonsillen vorhanden ist.

Nach unseren Untersuchungen ist die Streptokokkenflora in den bovinen Tonsillen recht mannigfaltig. Die Viridans-Streptokokken stehen mit 36,3% zahlenmäßig an der Spitze. Es folgen die Mastitis-Streptokokken (Sc. uberis, Sc. dysgalactiae, Sc. agalactiae) mit zusammen 33,3%, die Enterokokken mit 13,3%, der Sc. pyogenes animalis mit 10,5%. Der Sc. agalactiae und der Sc. salivarius waren mit nur je drei Stämmen vertreten. Vier Stämme konnten mangels charakteristischer biochemischer Merkmale und negativer Präcipitationsergebnisse nicht bestimmt werden.

Unter den Mastitis-Streptokokken wurden der Sc. uberis 18mal und der Sc. dysgalactiae 14mal und damit weit häufiger isoliert als der Sc. agalactiae. Diese Feststellung bedeutet keine Stütze für die Annahme eines Infektionsweges der Mastitis-Streptokokken von den Tonsillen zum Euter; denn die Fälle von Agalactiae-Mastitis überwiegen immer noch gegenüber den Infektionen des Euters bzw. den Mastitiden durch Sc. dysgalactiae und Sc. uberis. Die ferner in den Tonsillen gefundenen Enterokokken, die Salivarius-Stämme sowie Streptokokken vom Typ des Sc. pyogenes animalis spielen als Mastitiserreger keine Rolle.

Auffallend ist das zahlreiche Vorkommen von Viridans-Streptokokken. Bezüglich ihres Vorkommens bei Euterentzündung ist zu sagen, daß in der Literatur kein Fall von Viridans-Mastitis bekannt ist. Wir selbst konnten einmal aus einer eingeschickten Sekretprobe Sc. viridans II in Reinkultur herauszüchten. Der behandelnde Tierarzt teilte uns hierzu mit, daß sie von einer Kuh mit zwei klinisch erkrankten Eutervierteln und den Symptomen einer Allgemeinerkrankung stammte. Nach anscheinender klinischer Heilung durch entsprechende Behandlung trat nach etwa 1 Jahr ein Rezidiv auf, wobei wiederum der Viridanstyp II ermittelt wurde. Wir erfuhren später, daß die Mastitis nach interzisternaler Injektion von Supracillin-forte und Terramycin-Emulsion geheilt war.

Somit sind zwar die Tonsillen des Rindes eine nicht unbedeutende Fundgrube für eine Reihe von Streptokokkenarten, die man wohl als „normale", für die Tonsillen nicht pathogene Bewohner ansehen kann. Die Frage jedoch, ob den Tonsillen bei der Entstehung einer Streptokokken-Mastitis eine Bedeutung als ätiologischer Faktor zukommt, muß offen bleiben. Es besteht jedoch nach unseren derzeitigen Beobachtungen kein Grund zu der Annahme, in dem Vorhandensein von Streptokokken in den Tonsillen des Rindes einen Focus zu erblicken, von dem aus Streptokokken in die fern liegende Milchdrüse verschleppt werden.

Zusammenfassung

Es wurden die Tonsillen von 62 Rindern auf Streptokokkenvorkommen untersucht und dabei 105 Streptokokkenstämme isoliert. Folgende Streptokokkenarten konnten differenziert werden: Viridans-Streptokokken 38mal, Streptokokken vom Typ des Sc. uberis 18mal, des Sc. dysgalactiae 14mal, des Sc. agalactiae 3mal, Enterokokken 14mal, Sc. pyogenes animalis 11mal, Sc. salivarius 3mal; nicht bestimmbar waren 4 Stämme. Der Sc. agalactiae war nur mit 3 Stämmen = 2,9% vertreten. Sc. dysgalactiae und Sc. uberis, die bei Mastitiden und Euterinfektionen gegenüber den Galtstreptokokken nicht so häufig vorkommen, sowie die Viridans-Streptokokken, die Enterokokken und der Sc. pyogenes animalis, die als Mastitiserreger noch seltener gefunden werden, wurden weit häufiger isoliert. Diese Feststellung spricht nicht für eine Bedeutung der Tonsillen als Focus, von dem aus auf hämatogenem Wege eine Infektion der Milchdrüse erfolgt. Die Streptokokkenflora gehört offenbar zur „normalen" Keimbesiedlung der gesunden bovinen Tonsillen, wobei anzunehmen ist, daß die Keime von der Außenwelt, insbesondere mit dem „infizierten" Futter oder Wasser aufgenommen und in der Schleimhaut der Tonsillen „abgefangen" werden.

Literatur

[1] Feldman, H. A., and W. Harmon: Comparative effectiveness of direct blood agar and modified pike's broth for demonstrating betahemolytic streptococci of different serological groups. J. Lab. clin. Med. **40**, 297 (1952).

[2] Fornoni, Q.: Ricerca degli streptococchi agalactiae, dysgalactiae ed uberis nelle tonsille di bovini e suini. Vet. ital. **9**, 201 (1958).

[3] Obiger, G.: Untersuchungen über die in Rindertonsillen vorkommenden Streptokokken. Kieler Milchw.-Forschber. **6**, 631 (1954).

[4] Obiger, G., u. M. Seelemann: Zur Frage der Identität von Lancefield's Gruppe E-Streptokokken und Sc. uberis. — I. Teil: Das „Uberis-Gruppe-E-Problem" in historischer Betrachtung. (Eine kritische Besprechung des einschlägigen Schrifttums). Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **181**, 285—304 (1961). — II. Teil: Versuche zur Herstellung eines gruppenspezifischen Serums zur Differenzierung von Gruppe E-Streptokokken und Sc. uberis. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **183**, 432—443 (1961).

[5] Seelemann, M.: Biologie der Streptokokken, 2. Aufl. Nürnberg: Hans Carl 1954.

[6] Seelemann, M., u. G. Obiger: CAMP-Test und TKT-Medium, ihre Bedeutung für Galtdiagnose und Galtbekämpfung. Milchw. **11**, 98, 134 (1956).

[7] Seelemann, M., u. G. Obiger: Biologie, Klassifizierung und Nomenklatur der sog. vergrünenden Streptokokken. Nürnberg: Hans Carl 1958.

[8] Sherman, J. M., C. F. Niven and K. L. Smiley: Streptococcus salivarius and other non-hemolytic streptococci of the human throat. J. Bact. **45**, 249 (1943).

Dr. G. Obiger,
Institut für Milchhygiene der Bundesforschungsanstalt für Milchwirtschaft,
23 Kiel, Hermann Weigmann-Str. 3—11

Zeitschrift f. Hygiene 148, 412—432 (1962)

Aus der Virusabteilung am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Medizinischen Akademie Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. W. Kikuth)

Untersuchungen mit komplementbindenden G-, V- und S-Antigenen bei der experimentellen und natürlichen Herpes simplex-Infektion*

Von

Ferdinand Müller, Karin Hermes, Wolfgang Hermes und Lore Bockholt

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Januar 1962)

Seitdem die Virusätiologie der Herpes simplex (H. s.)-Infektion durch den Erregernachweis erkannt und die Adaptation des Virus auf verschiedene empfängliche Tiere (Literatur bei Remlinger u. Bailly 1927), den bebrüteten Hühnerembryo (Literatur bei Sohier, Peillard, Challut u. Chardonnet 1955) und schließlich auf verschiedene, in vitro kultivierbare Gewebe (Literatur bei McNair Scott, Burgoon, Coriell u. Blank 1954) gelungen war, ergaben sich Möglichkeiten zur Herstellung von Antigenen für diagnostische und immunologische Untersuchungen. Es hat seitdem nicht an Versuchen gefehlt, die Antikörperbildung während der Infektion zu beobachten sowie diagnostisch oder differentialdiagnostisch auszuwerten. Dieses Interesse findet seine Erklärung nicht nur in der Tatsache, daß es mit den zur Verfügung stehenden virologischen und virusserologischen Methoden häufig nicht gelingt, bei Patienten mit dem Encephalitissyndrom eine ätiologische Abklärung vorzunehmen. Insbesondere im Hinblick auf die immunologischen Verhältnisse bei dieser Virusinfektion waren von den Ergebnissen serologischer Untersuchungen bei H. s.-Patienten wichtige Aufschlüsse zu erwarten. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß trotz des Vorhandenseins neutralisierender und komplementbindender Antikörper, die wenige Tage nach der Primärinfektion im Serum der Patienten nachweisbar werden, rezidivierende Manifestationen des H. s.-Virus bei dazu disponierten Personen auftreten können. Auf Grund dieser Beobachtungen blieb es lange Zeit unklar, ob bei der Infektions- oder der Erkrankungsabwehr des H. s.-Antikörper überhaupt eine Rolle spielen. Es wurde diskutiert, ob es sich bei der H. s.-Immunität nicht vielmehr ausschließlich um lokale, zellgebundene Mechanismen handelt, die gestört sein müssen, wenn es zum endogenen Rezidiv kommen soll.

* Herrn Prof. Dr. W. Kikuth zum 65. Geburtstag gewidmet.

Diese Diskussion erhielt einen neuen Aspekt, als Lippelt u. Söltz-Szöts (1959) in Versuchen am Meerschweinchen zeigten, daß eine Reinfektion der Tiere nur dann gelingt, wenn Antikörper, die sich gegen ein lösliches komplementbindendes Antigen des H. s.-Virus richten, noch nicht angestiegen oder wieder zur Norm bzw. auf einen niedrigen Basistiter abgesunken sind. Durch diese Befunde schien die ältere Beobachtung bestätigt, wonach den neutralisierenden sowie komplementbindenden Antikörpern gegen ein virusgebundenes Antigen im Hinblick auf den Infektionsschutz keine Bedeutung zukommt. Entsprechende Verhältnisse sollen auch beim Menschen bestehen (Lippelt 1961). Damit wurde der Schwerpunkt immunologischer Betrachtungen auf den Antikörper gegen ein lösliches Antigen des H. s.-Virus verlagert. Solche Antikörper waren mit entsprechenden Antigenpräparationen zuvor schon von Balducci, Tyrrell u. Stuart-Harris (1956); Hayward (1949, 1950); Jawetz, Coleman u. Allende (1951) sowie von McNair Scott, Burgoon, Coriell u. Blank (1954) nachgewiesen worden. Einblicke in die immunologischen Verhältnisse bei der H. s.-Infektion sind aus diesen Publikationen jedoch nicht zu gewinnen.

Unsere eigenen Arbeiten am Problem der H. s.-Serologie erhielten durch die vorgenannte Arbeit von Lippelt u. Söltz-Szöts (1959) neue Ansatzpunkte. Die meisten vorhergehenden Untersuchungen zur Frage der Bedeutung komplementbindender Antikörper für die Immunität nach H. s.-Infektionen sind gar nicht oder nur sehr schwer miteinander vergleichbar. Es wurde nicht nur mit verschiedenen Antigenpräparationen gearbeitet (infiziertes Kaninchen- oder Mäusegehirn, infizierte Kulturen von Kaninchennieren- oder Hühnerembryonalgewebe, Membranen oder Flüssigkeiten des infizierten, bebrüteten Hühnerembryo), sondern auch mit unterschiedlichen Virusstämmen. Ob mit den differenten Antigenen identische Antikörper erfaßt werden, ist nicht sicher. Daß verschiedene Stämme des H. s.-Virus zu unterschiedlichen serologischen Ergebnissen führen, kann dagegen keinem Zweifel unterliegen. Aber selbst bei Verwendung gleichartiger Antigene stehen die von verschiedenen Autoren erhobenen Befunde teilweise zueinander in Widerspruch.

Die wesentlichen Fakten der Virologie, Epidemiologie und Immunbiologie der H. s.-Infektion wurden erst kürzlich von Weisse (1960) zusammenfassend dargestellt. Hierauf kann verwiesen werden. In der vorliegenden Mitteilung konnten und sollten nur einzelne Probleme des Gesamtkomplexes der H. s.-Serologie bearbeitet werden. Unsere Untersuchungen gingen zunächst von der Frage aus, ob Gewebekulturantigene denjenigen aus dem bebrüteten Hühnerembryo wirklich unterlegen sind, wie dies von verschiedenen Autoren angenommen worden ist (vgl. Lippelt u. Söltz-Szöts 1959). Entsprechende Vorversuche in unserem

Laboratorium hatten an der Richtigkeit dieser Ansicht Zweifel aufkommen lassen. Die gewünschten Informationen waren am besten unter den kontrollierten Bedingungen des Tierexperiments zu gewinnen.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob es möglich ist, eine sichere Differenzierung von Antikörpern gegen virusgebundenes (V) und lösliches (S) Antigen vorzunehmen und aus diesen Befunden diagnostische Folgerungen zu ziehen. An dieses Problem schließt sich unmittelbar die Frage an, ob — wie dies von Schmidt, Lennette u. Shon (1960) festgestellt worden war — die Antigenität des H.s.-Virus an die Infektiosität oder zumindest an das Virusteilchen selbst gebunden ist. In engem Zusammenhang hiermit steht das Problem der Strukturunterschiede verschiedener H.s.-Virusstämme, welche die Antigenität beeinflussen.

Und schließlich war es ein Ziel unserer Untersuchungen festzustellen, ob es mit Antigenen, die sich im Tierversuch als besonders wirksam erwiesen hatten, möglich ist, diagnostische oder epidemiologische Untersuchungen beim Menschen durchzuführen.

Material und Methoden

1. Virusstämme. Für die vorliegenden Untersuchungen standen uns die Herpes simplex-Virusstämme *Thöres* und *Derm* zur Verfügung. Der Stamm *Thöres* wurde ursprünglich von Herrn Prof. Dr. Herzberg (damals Marburg/Lahn) aus menschlichem Untersuchungsmaterial isoliert. Im Chemotherapeutischen Laboratorium der Farbenfabriken Bayer, Wuppertal-Elberfeld, war das Virus, das in Form einer Mäusegehirnpräparation vorlag, auf die Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnerembryonen adaptiert worden. Wir erhielten Material der 65. Passage im bebrüteten Hühnerei[1]. Vor der Antigenpräparation führten wir drei weitere Passagen im Brutei durch. Danach betrug der Titer der Infektiosität dieses Virusstammes $10^{-7,0}$/ml der in 0,5 ml Hanks-Lösung homogenisierten Chorioallantoismembran, geprüft in Hela-Zellen.

Der Stamm *Derm* wurde uns freundlicherweise in Form von infiziertem Mäusegehirn von den Behringwerken A.G., Marburg/Lahn, überlassen. Er wurde in unserem Laboratorium auf Kaninchennierenzellen adaptiert und zeigte in der fünften Passage einen Infektionstiter von $10^{-5,0}$/ml Gewebekulturüberstand, geprüft in Kaninchennierenepithelzellen.

2. Herstellungsverfahren für Antigene aus der Gewebekultur. Die Präparation von Monolayer-Kulturen trypsinierter Kaninchennierenepithelzellen erfolgte analog den Verfahren für die Herstellung von Affennierenkulturen. Die in unserem Laboratorium übliche Methode wurde an anderer Stelle beschrieben (Müller 1961). Für die Versuche, über die in dieser Arbeit berichtet wird, wurden nur primäre Zellkulturen verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten die Nieren von etwa 3—5 Wochen alten Kaninchen. Zum Teil wurde dem Wachstumsmedium 10—20% Pferde-, zum Teil 5% Rinderserum zugesetzt.

Nach Ausbildung eines vollständigen, gleichmäßigen Zellrasens in Vierkantflaschen (Schott u. Gen.) erfolgte die Infektion der Zellen mit virushaltigem Ausgangsmaterial (siehe oben) oder Gewebekulturüberstand der Vorpassage.

[1] Wir danken Herrn Doz. Dr. Gönnert, Wuppertal-Elberfeld, für die freundliche Überlassung des Virusstammes.

Innerhalb von 2—3 Tagen fanden sich zunächst herdförmig über das Gewebe verteilt Riesenzellen. Nach vollständiger Zellzerstörung durch das Virus wurde das Material geerntet, dreimal bei −70° C eingefroren und wieder aufgetaut und zur Entfernung von Zelldetritus anschließend 15 min bei 4000 U.p.M. zentrifugiert. Der danach verbleibende Überstand wird in dieser Arbeit als *G-Antigen* bezeichnet.

Für einzelne Versuchsansätze wurde Überstand der mit dem Stamm *Thöres* infizierten fünften Gewebekulturpassage nach den noch zu besprechenden Grundsätzen mit Äther behandelt. Die danach resultierende Präparation erhielt die Bezeichnung *Antigen G-Ä* (vgl. Abb. 1 A).

3. Herstellungsverfahren für Antigene in bebrüteten Hühnerembryonen. 11 Tage bei 37° C vorbebrütete Hühnerembryonen wurden nach einer früher beschriebenen Methode infiziert (Brand u. Müller 1954). Dabei wurden 0,2 ml einer Suspension infizierter Chorioallantoismembranen der Vorpassage in den Allantoissack des Bruteies injiziert. Nachbebrütung der Eier bei 36° C. Die Gewinnung der Chorioallantoismembranen und -flüssigkeiten erfolgte im allgemeinen etwa 50 Std nach der Injektion, wenn die Embryonen infolge der Infektion abgestorben waren.

Chorioallantoismembranen und -flüssigkeiten wurden nach dem in Abb. 1 B angegebenen Schema zu *virusgebundenem (V)* und *löslichem (S)* Antigen aufgearbeitet.

Die Überprüfung der Chargen des sogenannten S-Antigens ergab, daß diese meistens noch infektiöse Virusteilchen enthielten. Deshalb wurde der nach hochtouriger Zentrifugation (1 Std, 30000 g) herpesinfizierter und homogenisierter Chorioallantoismembranen verbleibende Überstand nach den von Hoyle (1950) bzw. von Lief u. Henle (1956) ursprünglich zur Reindarstellung von S-Antigenen aus Influenzaviruspräparationen angegebenen Verfahren aufgearbeitet. Der Membranüberstand wurde im Verhältnis 2:1 mit Äther (pro narcosi) versetzt und der Ansatz 2 Std bei 37° C mit einem Magnetrührer gleichmäßig vermischt. Der bei diesem Vorgehen durch Verdampfen entstehende Ätherverlust wurde in etwa halbstündigen Abständen auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde im Scheidetrichter die ätherhaltige von der wäßrigen Phase getrennt und der Ätherrest aus der wäßrigen Phase durch Verdampfen über etwa 10 Std bei 37° C entfernt. Das auf diese Weise gewonnene Antigen wird als *S-Ä* bezeichnet. Es zeigt keinerlei Infektiosität für den bebrüteten Hühnerembryo mehr.

4. Immunseren von Meerschweinchen nach Herpes simplex-Infektion. 20 gesunde Meerschweinchen beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht zwischen 400—600 g wurden im Abstand von 8 Tagen zweimal mit je 1,0 ml intraperitoneal und nach weiteren 8 Tagen einmal mit 0,5 ml subcutan mit dem Herpes simplex-Virus, Stamm *Thöres*, infiziert. Als Viruspräparation wurde der aktive (infektiöse) Überstand einer infizierten Kaninchennierenzellkultur verwendet.

Während der Immunisierung verloren wir sechs Tiere. Diese Meerschweinchen zeigten, soweit sie seziert wurden, die charakteristischen, bakteriologisch sterilen, multiplen Nekroseherde in den Lungen und in der Leber, wie sie als Folge einer Herpes simplex-Sepsis bekannt sind und von Slavin u. Berry (1943) beschrieben wurden. Eine histologische Untersuchung auf Einschlußkörperchen wurde nicht durchgeführt. Bei einem der Tiere waren verschiedene Serumproben antikomplementär. Dieses Meerschweinchen wurde bei der Zusammenstellung der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Eine zweite und eine dritte Gruppe von je zehn Meerschweinchen der oben beschriebenen Art erhielt im Abstand von 3 Wochen 1,0 ml intraperitoneal und 0,5 ml subcutan des Gewebekulturüberstandes der ersten bzw. der fünften Passage des Virusstammes *Derm.* Bei diesem Versuch, gleichfalls mit infektiösem Material, verloren wir interkurrent aus jeder Gruppe drei Tiere.

Entsprechend dem Schema der Abb. 2 wurde den mit dem Stamm *Thöres* infizierten Tieren in verschiedenen Zeitabständen zur Infektion bzw. Reinjektion durch Herzpunktion Blut entnommen. Bei den mit dem Stamm *Derm* infizierten Tieren erfolgte die einmalige Blutentnahme post infectionem 14 Tage nach der zweiten Virusinjektion. Das Serum wurde sogleich nach der Entnahme vom Blutkuchen getrennt und bis zur Aufarbeitung in der Komplementbindungsreaktion bei −20° C aufbewahrt.

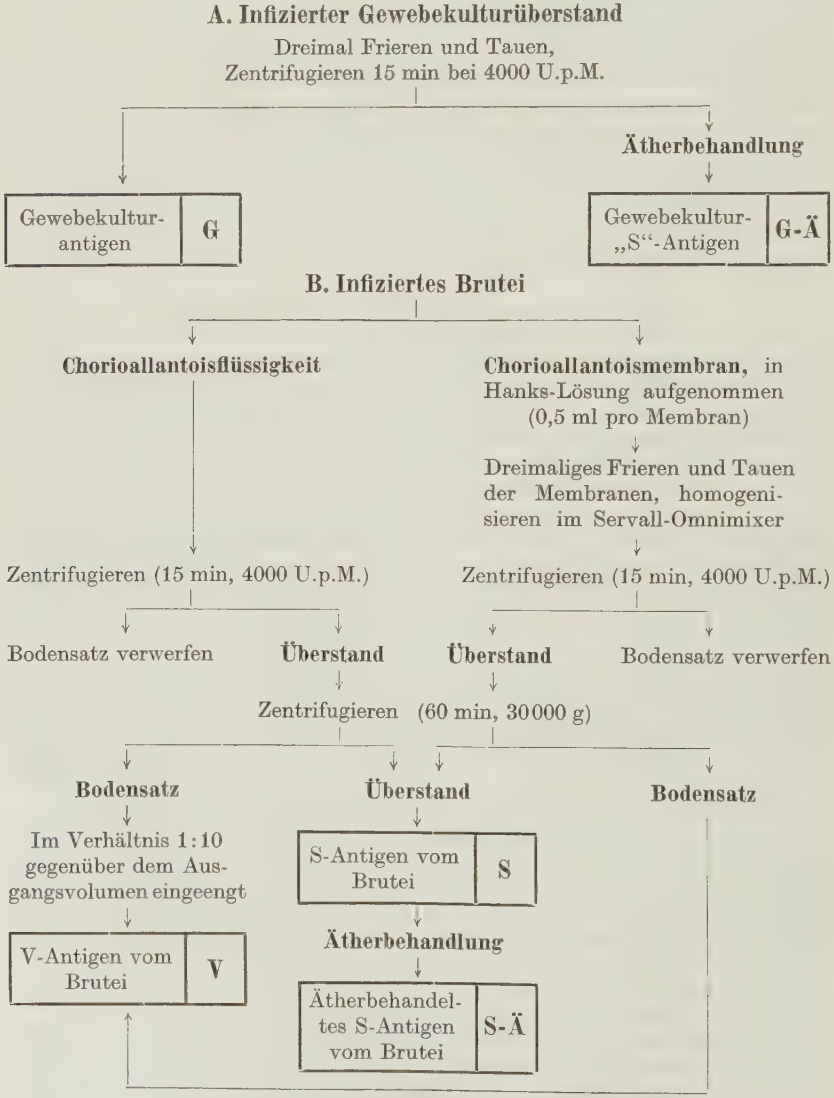


Abb. 1. *Herstellung der Antigene für die Herpes simplex-Komplementbildungsreaktion* (Erklärungen im Text)

5. Immunseren von Patienten mit diagnostisch unklaren neurologischen Krankheitserscheinungen. Für diese Untersuchungen standen die Serumproben von insgesamt 204 Patienten verschiedenen Alters mit klinisch unklaren neurologischen Symptomen zur Verfügung. In den meisten Fällen handelte es sich um Serumpaare mit der ersten Probe aus der akuten und einer weiteren Probe aus der Rekonvaleszenzphase der Erkrankung. Bei einzelnen der Erkrankungsfälle ließ sich die Ätiologie durch gleichzeitig durchgeführte virologische oder serologische

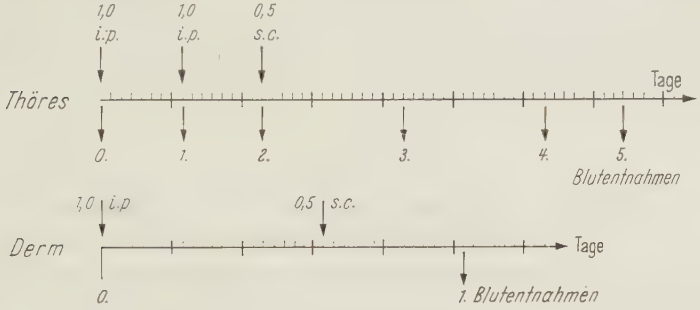


Abb. 2. *Schematische Darstellung der Antigengaben und der Blutentnahmen bei Meerschweinchen* (Erklärungen im Text)

Reaktionen anderer Art (Poliomyelitis-, Mumps-, Coxsackie-Infektionen) oder durch den Operations- bzw. den Sektionsbefund (Hirntumoren usw.) klären. Bei diesen Patienten konnte eine akute Herpes simplex-Infektion dadurch mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

6. Technik der Komplementbindungsreaktion. Die in unserem Laboratorium übliche Testmethodik wurde an anderer Stelle bereits detailliert dargestellt (Müller 1961). Es handelt sich dabei um einen modifizierten *Kolmer*-Test mit $^1/_{10}$ Dosen. Durch Standardisierung des hämolytischen Indicatorsystems (sensibilisierte Hammelerythrocyten) und bei Verwendung *einer* Komplementcharge für alle Versuche ist die Konstanz und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet. Alle notwendigen Kontrollen, einschließlich derjenigen mit Normal-Antigenen, wurden in jedem Versuchsansatz berücksichtigt, um Unspezifitäten so weitgehend als irgend möglich auszuschalten.

Die Meerschweinchenseren wurden ebenso wie die Serumproben vom Menschen vor der Verwendung im Komplementbindungstest für 30 min bei 56° C im Wasserbad „inaktiviert". Alle Versuche wurden mindestens doppelt und an verschiedenen Tagen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu kontrollieren.

Im *Antigenvorversuch* wurde zunächst die komplementbindende Aktivität der einzelnen Antigene im Blocktest mit Serumverdünnungen eines stammhomologen Anti-Herpes simplex-Immunserums vom Meerschweinchen bestimmt. Diese betrug bei den Präparationen aus dem *Thöres*-Stamm für das G-Antigen 1:32, für das G-Ä-Antigen 1:32, für das V-Antigen 1:20, für das S-Antigen 1:40 und für das S-Ä-Antigen 1:60. Das mit dem Stamm *Derm* hergestellte G-Antigen zeigte eine vollständige Hemmung der Hämolyse in Gegenwart von homologem Antikörper bis zur Verdünnung von 1:16.

Sowohl im Antigenvorversuch als auch im Hauptversuch wurden die Antikörpertiter bzw. Antigentiter durch Ermittlung der Röhrchen mit 100%iger Hämolysehemmung ermittelt. Eine teilweise Hemmung der Hämolyse wurde also nicht berücksichtigt.

Um sicher zu gehen, daß die Hauptversuche nicht im Antigendefizit oder -überschuß angesetzt worden sind, wurden diese zum Teil in Blocktitrationen mit verschiedenen Antigenkonzentrationen wiederholt.

7. Infektiositätsbestimmungen bei den Antigenpräparationen. Alle Antigenpräparationen wurden auf die Gegenwart von vermehrungsfähigem Virus im Bruteiverfahren (nach dem eingangs geschilderten Verfahren) und vergleichsweise in der Gewebekultur (Hela- oder Kaninchennierenepithelzellen) geprüft. Als *virus-positiv* werden diejenigen Antigene bezeichnet, bei denen nach Verimpfung von 0,2 ml der konzentrierten Präparation mindestens in einem von zehn beimpften Hühnerembryonen typische Läsionen auf der Chorioallantoismembran oder in einem von zehn Gewebekulturröhrchen ein charakteristischer cytopathogener Effekt nachzuweisen war.

Ergebnisse

Vergleichende Untersuchungen mit komplementbindenden G- und V-Antigenen

Für das Experiment standen jeweils sechs Serumproben von 13 Meerschweinchen vor bzw. nach dreimaliger Injektion von Herpes simplex-Virus, Stamm *Thöres*, zur Verfügung, die im gleichen Versuchsansatz gegen G- und V-Antigen (Stamm *Thöres*) geprüft wurden. Wie sich aus Tab. 1 ergibt, hatte keines der Tiere vor Versuchsbeginn komplementbindende Antikörper gegen eine der verwendeten Antigenpräparationen.

Tabelle 1. *Komplementbindende Antikörper bei Meerschweinchen nach Immunisierung mit Herpes simplex-Virus (Stamm Thöres) gegen verschiedene Antigenpräparationen*

Tier Nr.	Antigen	Titer komplementbindender Antikörper					
		vor der Immunisierung	8 Tage nach d. 1. Inj. (8. Tag nach Vers.beginn)	8 Tage nach d. 2. Inj. (16. Tag nach Vers.beginn)	14 Tage nach d. 3. Inj. (30. Tag nach Vers.beginn)	28 Tage nach d. 3. Inj. (44. Tag nach Vers.beginn)	36 Tage nach d. 3. Inj. (52. Tag nach Vers.beginn)
1	G	0	4	32	64	16	8
	V	0	4	4	4	4	4
	S	0	4	8	4	0	0
	S-Ä	0	4	8	4	4	—
2	G	0	64	64	64	32	16
	V	0	8	8	16	16	16
	S	0	4	4	4	4	4
	S-Ä	0	8	8	8	8	4
3	G	0	16	32	32	8	8
	V	0	0	4	16	8	4
	S	0	0	4	4	4	4
	S-Ä	0	4	4	4	8	4
4	G	0	4	64	32	16	32
	V	0	—	8	4	4	8
	S	0	0	4	8	8	4
	S-Ä	0	4	4	4	4	4

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Tier Nr.	Antigen	Titer komplementbindender Antikörper					
		vor der Immunisierung	8 Tage nach d. 1. Inj. (8. Tag nach Vers.beginn)	8 Tage nach d. 2. Inj. (16. Tag nach Vers.beginn)	14 Tage nach d. 3. Inj. (30. Tag nach Vers.beginn)	28 Tage nach d. 3. Inj. (44. Tag nach Vers.beginn)	36 Tage nach d. 3. Inj. (52. Tag nach Vers.beginn)
5	G	0	8	16	32	8	16
	V	0	4	—	4	4	8
	S	0	0	4	16	16	4
	S-Ä	0	0	4	4	4	4
6	G	0	8	32	64	16	16
	V	0	8	8	8	32	4
	S	0	16	16	16	8	8
	S-Ä	0	0	4	4	16	4
7	G	0	4	16	32	8	8
	V	0	4	4	0	4	8
	S	0	0	0	0	0	4
	S-Ä	0	0	4	4	8	4
8	G	0	0	32	32	16	4
	V	0	4	4	4	8	4
	S	0	0	—	8	4	0
	S-Ä	0	4	—	8	4	4
9	G	0	0	32	64	32	0
	V	0	4	4	8	8	8
	S	0	0	0	0	0	0
	S-Ä	0	4	4	4	4	4
10	G	0	8	32	32	16	4
	V	0	4	8	0	4	4
	S	0	0	4	—	4	4
	S-Ä	0	4	4	—	4	4
11	G	0	4	128	64	32	8
	V	0	8	16	16	16	8
	S	0	0	4	4	0	0
	S-Ä	0	0	0	8	4	4
12	G	0	4	8	32	16	4
	V	0	4	8	8	4	0
	S	0	4	4	4	4	0
	S-Ä	0	8	8	8	4	4
13	G	0	0	16	32	16	—
	V	0	0	4	4	8	—
	S	0	4	4	4	4	—
	S-Ä	0	4	4	8	0	—

Zeichenerklärung. Die Titer der komplementbindenden Antikörper sind als reziproke Werte der jeweiligen Serumverdünnungsstufen angegeben. 0 = kleiner als 1:4; — = nicht durchgeführt; G = Gewebekulturantigen aus Kaninchennierenepithelzellen; V = V-Antigen aus dem bebrüteten Hühnerembryo; S-Ä = Äther-behandeltes S-Antigen aus dem bebrüteten Hühnerembryo. Bei allen Antigenen handelt es sich um Präparationen des infektionshomologen Virusstammes *Thöres*.

Bei fast allen Tieren wurden während des ganzen Versuchsverlaufes mit dem G-Antigen höhere Antikörpertiter gefunden als bei Verwendung von V-Antigen aus dem Brutei. Eine weitere Differenz ist auffallend: Mit dem G-Antigen wird der höchste Antikörpertiter bereits in der 5. Woche nach Versuchsbeginn ermittelt. Die Antikörper gegen das V-Antigen steigen dagegen bis zur 7. Woche langsam aber kontinuierlich an. Zum Zeitpunkt des Titermaximums (5. bzw. 7. Woche nach Versuchsbeginn) schwanken die G-Antikörper zwischen 1:32 und 1:64, die V-Antikörper zwischen 1:4 und 1:32. Eine graphische Darstellung der Mittelwerte zu den einzelnen Zeitpunkten der Blutentnahmen gibt Abb. 3.

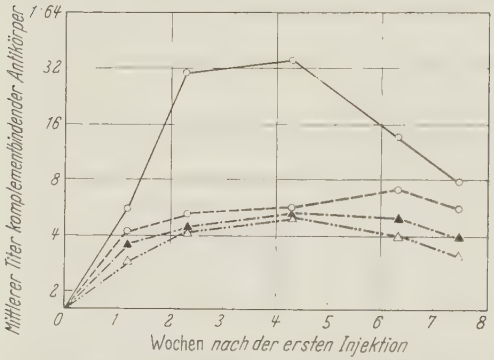


Abb. 3. *Mittelwerte komplementbindender Antikörper nach Infektion von 13 Meerschweinchen mit Herpes simplex-Virus, Stamm Thöres, bestimmt mit verschiedenen Antigenen des homologen Virusstammes.* o —o G-Antigen (Kan.nieren); o— — —o V-Antigen (Brutei); ▵··—··▵ S-Antigen (Brutei); ▲— ·—▲ (S-Ag vom Brutei, Äther-behandelt)

Als Ursache für das bessere Ergebnis, welches mit dem G-Antigen gewonnen wurde, können gleichzeitig erfaßte, gegen das Zellsubstrat gerichtete Antikörper mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Zwar wurden die Tiere mit H.s.-Virus, welches in der Gewebekultur gezüchtet worden war, infiziert. Die mit allen Seren angesetzten Gewebeleerkontrollen (nicht infizierte, dreimal gefrorene und getaute Kaninchennierenzellen) führten jedoch mit den Serumverdünnungen 1:4 in keinem Falle zu einer Hämolysehemmung. Auch eine Differenz in der antigenen Potenz der beiden Präparationen ist unwahrscheinlich. Beide Antigene wurden im Vorversuch nach denselben Grundsätzen ausgewertet; die Ergebnisse wurden außerdem — wie erwähnt — durch Blocktitrationen, d. h. mit Antigenüberschuß und -defizit, kontrolliert und bestätigt.

Während sich die G-Antikörper bereits in der 5. Woche nach Versuchsbeginn zu vermindern beginnen, wird das gleiche bei den V-Antikörpern erst in der 7. Woche beobachtet.

Vergleichende Untersuchungen mit komplementbindenden V- und S-Antigenen aus dem Brutei

Wie sich aus der Tab. 1 und der Abb. 3 weiterhin ergibt, zeigten die mit V- und S-Antigenen (aus dem Brutei) ermittelten Antikörper während des Versuchsverlaufes keine sehr großen Titerdifferenzen; der Anti-V-Titer lag lediglich geringgradig über dem Anti-S-Titer. Auch der

Verlauf der beiden Kurven ist bis zur 5. Woche nach Versuchsbeginn praktisch parallel. Es fällt vielleicht auf, daß die S-Antikörper etwas früher wieder absinken als diejenigen gegen das V-Antigen. In der 8. Woche hatten von den untersuchten 12 Meerschweinchen nur 1 keinen nachweisbaren V-, dagegen 5 keinen in der Serumverdünnung 1:4 darstellbaren S-Antikörpertiter mehr. Dieser Unterschied kann aber zufallsbedingt sein und berechtigt sicherlich nicht zu irgendwelchen Folgerungen.

Da das verwendete S-Antigen aus dem Brutei trotz hochtouriger Zentrifugation noch einzelne infektiöse Viruspartikeln enthielt, wurde es einer Ätherbehandlung unterzogen. Die mit dem nunmehr seiner Infektiosität vollständig beraubten Antigen (S-Ä) erhobenen serologischen Befunde sind gleichfalls in Tab. 1 und Abb. 3 enthalten. Die Abweichungen der Antikörpertiter sind gegenüber denjenigen, welche mit unbehandeltem S-Antigen ermittelt wurden, so gering, daß eine Signifikanzberechnung schon auf den ersten Blick sinnlos erscheint.

Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Infektiosität und Antigenität in der Komplementbindungsreaktion

Auf diese Weise war eine sichere Information über mögliche Unterschiede zwischen V- und S-Antigenen bzw. den jeweils homologen Antikörpern nicht zu erhalten. Da in unseren Versuchen das G-Antigen mit den H.s.-Immunseren vom Meerschweinchen wesentlich besser reagierte, versprachen wir uns von einer Ätherbehandlung einer solchen Antigenpräparation nähere Aufschlüsse über die diskutierten Zusammenhänge zwischen Infektiosität und Antigenität.

Trotz zweistündiger Äthereinwirkung bei 37°C und nachfolgender Einwirkung von 37°C für etwa 20 Std gelang es nicht, die Infektiosität des G-Antigens vollständig zu zerstören. Die nachweisbare Menge aktiven Virus war jedoch sehr gering.

Tabelle 2. *Titer komplementbindender Antikörper gegen unbehandeltes und Äther-behandeltes Herpes simplex-Antigen (Stamm Thöres) aus der Gewebekultur*

Tier- und Serum-Nr.	Komplementbindende Antikörper gegen Herpes simplex-Gewebekulturantigen	
	vor Ätherbehandlung (G)	nach Ätherbehandlung (G—Ä)
7—4	1: 8	1: 4
9—3	1: 64	1: 32
11—2	1:128	1:128

Für das folgende Experiment wurden eine Reihe von Einzelseren ausgewählt, die den Tieren zu verschiedenen Zeiten nach Versuchsbeginn entnommen worden waren und einen unterschiedlichen Antikörpertiter aufwiesen. An drei Beispielen wird in der Tab. 2 das Ergebnis dieses Versuches dargestellt. Alle geprüften Seren reagierten mit dem G- und dem G-Ä-Antigen mit praktisch identischen Antikörpertitern. In

einzelnen Fällen war der mit dem G-Ä-Antigen ermittelte Titer eine Verdünnungsstufe niedriger als der Titer der G-Antikörper. Das Umgekehrte wurde nicht beobachtet. Diese Differenz ist zu klein, um Folgerungen zu gestatten.

Damit scheint es zunächst so, als ob die Antigenität im Komplementbindungstest nicht an die Infektiosität des Virusmaterials gebunden ist. Die Einwände, welche gegen diese Aussage gemacht werden können, werden noch zu diskutieren sein.

Untersuchungen über Antigenunterschiede bei verschiedenen Herpes simplex-Virusstämmen

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, inwieweit Unterschiede in der Antigenstruktur verschiedener H.s.-Virusstämme das Ergebnis der Komplementbindungsreaktion beeinflussen. Um zu brauchbaren Resultaten zu gelangen, wurden diese Untersuchungen nur mit G-Antigenen durchgeführt.

Tabelle 3

Komplementbindende Antikörper gegen Thöres-Gewebekulturantigen (G) nach Infektion von Meerschweinchen mit den Herpes simplex-Virusstämmen Derm und Thöres

Virusstamm	Infektionsmodus	Zeitpunkt der Blutentnahme	Anzahl der Tiere	Mittlerer Titer komplementbindender Antikörper gegen *Thöres*-G-Antigen
Derm, 1. GK-Pass.	1,0 ml i.p. und 0,5 ml s.c. im Abstand von 3 Wochen	10 Tage nach der 2. Inj.	7	1: 3
Derm, 5. GK-Pass.	1,0 ml i.p. und 0,5 ml s.c. im Abstand von 3 Wochen	10 Tage nach der 2. Inj.	7	1: 7
Thöres, 6. GK-Pass.	1,0 ml i.p. und 1,0 ml i.p. im Abstand von 8 Tagen	8 Tage nach der 2. Inj.	13	1:40
Thöres, 6. GK-Pass.	1,0 ml i.p., 1,0 ml i.p. und 0,5 ml s.c. im Abstand von je 8 Tagen	14 Tage nach der 3. Inj.	13	1:45

Es wurden zunächst die mit den H.s.-Virusstämmen *Derm* und *Thöres* infizierten Meerschweinchen auf komplementbindende Antikörper gegen ein *Thöres*-G-Antigen getestet. Wie in der Tab.3 dargestellt, zeigten sich dabei — abhängig vom Infektionsstamm — deutliche

Differenzen. Mit dem heterologen Stamm *Derm* infizierte Tiere reagierten mit dem Antigen nur mit niedrigem Antikörpertiter, während im homologen System wesentlich höhere Titer registriert werden konnten.

Unsere Vermutung war zunächst, daß Infektionen mit dem Stamm *Derm* eine schwächere immunisierende Wirksamkeit entfalten als die mit dem Stamm *Thöres*. Diese Annahme erwies sich aber als falsch. Aus Tab. 4 ergibt sich, daß die mit dem Stamm *Derm* infizierten Meerschweinchen gegen das homologe G-Antigen einen hohen Titer komplementbindender Antikörper entwickeln, während der Antikörper gegen den heterologen *Thöres*-Stamm wesentlich schwächer ausgebildet war.

Tabelle 4. *Komplementbindende Antikörper gegen stammhomologes und stammheterologes Gewebekulturantigen (G) nach Infektion von Meerschweinchen mit dem Herpes simplex-Virusstamm Derm*

Virusstamm	Infektionsmodus und Zeitpunkt der Blutentnahme	Anzahl der Tiere	Mittlerer Titer komplementbindender Antikörper gegen	
			Thöres-G	*Derm*-G
Derm, 5. GK-Pass.	1,0 ml i.p. und 0,5 ml s.c. im Abstand v. 3 Wochen Blutentnahme 10 Tage nach der 2. Inj.	7	1:7	1:110

Danach scheint es so zu sein, als ob die beiden in unseren Versuchen ververwendeten H.s.-Virusstämme Antigenunterschiede aufweisen, die mit der Komplementbindungsreaktion bei Verwendung von G-Antigenen zu erkennen sind. Beide Stämme erwiesen sich als gut immunisierend wirksam, soweit dies aus dem Ergebnis der Komplementbindungsreaktion geschlossen werden kann. Im gekreuzten Test wird jeweils nur eine, den Stämmen gemeinsame Teilkomponente des Antigenmosaiks erfaßt.

Diagnostische und epidemiologische Untersuchungen mit Herpes simplex-G-Antigenen (Stamm Derm) beim Menschen

Bei der Auswertung der beim Menschen erhobenen Befunde sind die soeben getroffenen Feststellungen zu berücksichtigen. Von den Infektionen durch Virusstämme mit verschiedener Antigenstruktur würde bei Verwendung nur *eines Stammes* als Antigen eine verbindliche Information über die H.s.-Ätiologie des einzelnen Erkrankungsfalles oder über die Häufigkeit von H.s.-Infektionen in einer Bevölkerungsgruppe nur dann zu gewinnen sein, wenn eine gekreuzte Basisreaktion im Test nachgewiesen werden kann. Sowohl die Befunde anderer Autoren als auch die eigenen Beobachtungen lassen dies als wahrscheinlich erscheinen.

In einem Zeitraum von mehr als 2 Jahren (1959—1961) untersuchten wir 204 Personen mit verschiedenen neurologischen Krankheitsmanifestationen auf komplementbindende H.s.-Antikörper mit einem

G-Antigen (Stamm *Derm*). Nur in vier Fällen konnte auf Grund eines vierfachen Titeranstieges in der Komplementbindungsreaktion eine H.s.-Ätiologie der vorliegenden Erkrankung vermutet werden. Die bei diesen Patienten erhobenen Befunde sind in der Tab. 5 zusammengestellt. Eine Sicherung der serologischen Ergebnisse durch den Nachweis von H.s.-Virus aus Materialien dieser Personen war nicht möglich. Es muß daher selbst bei diesen Fällen, welche in anderer Richtung keine Klärung fanden, offen bleiben, ob das Ergebnis der Komplementbindungsreaktion wirklich Ausdruck einer primären H.s.-Infektion oder vielmehr als anamnestische Reaktion auf einen Infekt anderer Genese aufzufassen ist.

Tabelle 5

Serologische Ergebnisse bei Patienten mit Verdacht auf primäre Herpes simplex-Infektion

Lfd. Nr.	Name	Alter in Jahren	Klinische Diagnose	Titer komplementbindender G-Antikörper					
				1. Serum		2. Serum		3. Serum	
				Datum	Titer	Datum	Titer	Datum	Titer
1	J.K.	43	Facialisparese	30.7.	8	14.8.	32	—	—
2	K.K.	34	Encephalitis	17.9.	8	2.10.	32	14.11.	4
3	H.A.	56	Encephalitis	26.9.	0	16.10.	32	—	—
4	H.S.	9	Virus-Meningit.	26.9.	4	2.10.	16	21.10.	8

Tabelle 6. *Nachweis komplementbindender Antikörper gegen Herpes simplex-Virus, Stamm Derm, in Abhängigkeit vom Lebensalter*

Altersgruppe in Jahren	Anzahl der Personen	In der Herpes simplex-Komplementbindungsreaktion (G-Antigen, *Derm*)				
		negativ	positiv			Prozent positiv
			1 : 4	1 : 8	1 : 16 u. größer	
0—½	3	1	1	1	0	(67)*
½— 2	22	19	1	2	0	14
3—14	56	38	1	7	10	32
15—40	63	33	6	9	15	48
über 40	60	31	1	7	21	49
zusammen	204	122	10	26	46	40

* Wegen der kleinen Zahl der untersuchten Säuglinge nicht zu verwerten.

Die mit dem gleichen Antigen durchgeführten epidemiologischen Untersuchungen führten zu den in der Tab. 6 und in der Abb. 4 nach Altersgruppen aufgeschlüsselten Ergebnissen. Die Aufgliederung in Altersgruppen erfolgte in Anlehnung an Vivell, Hitzig u. Cremer (1957), um zu den im badischen Raum ermittelten Befunden eine Vergleichsbasis zu haben. Es zeigt sich, daß die primären Infektionen mit

dem H.s.-Virus — ähnlich den Verhältnissen bei anderen Virusinfektionen — im Kindesalter stattfinden. Nach unseren Befunden beträgt die Durchseuchung der Bevölkerung unseres Einzugsgebietes (Nordrhein-Westfalen) mit H.s.-Virusstämmen, welche mit dem Stamm *Derm* antigenverwandt sind, bei der erwachsenen Bevölkerung etwa 50%.

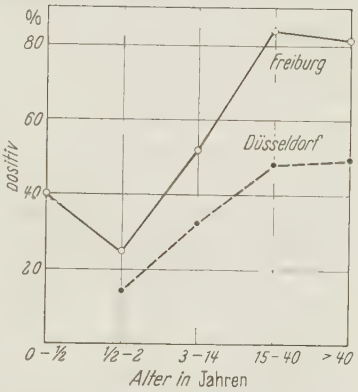


Abb. 4. *Vergleich der Durchseuchung der Bevölkerung im Lande Baden-Württemberg und im Lande Nordrhein-Westfalen* (Untersuchungen mit dem Herpes simplex-Virus in Freiburg und in Düsseldorf)

Diskussion

Die Komplementbindungsreaktion mit Antigenen verschiedener Herkunft (infiziertes Kaninchen- oder Mäusegehirn; Membranen und Flüssigkeiten bebrüteter und infizierter Hühnerembryonen; Überstände infizierter Gewebekulturen) ist von zahlreichen Autoren sowohl für die diagnostische Zwecke als auch zur Aufklärung der besonderen immunologischen Verhältnisse bei der H.s.-Infektion des Menschen und im Tierversuch angewendet worden. Auf Antigene aus Tiergehirnen wurde schon bald verzichtet, weil sich diese häufig als antikomplementär erwiesen und im bebrüteten Hühnerembryo ein nahezu ideales Kulturmedium für das H.s-Virus zur Verfügung stand (Hayward 1949, 1950; Dudgeon 1950; Fowler 1950; Jawetz, Coleman u. Allende 1951; Dascomb, Adair u. Rogers 1955; Gajdusek, Robbins u. Robbins 1952; Womack u. Hunt 1954; Hallonen 1955; Modi u. Tobin 1955; Sohier, Peillard, Challut u. Chardonnet 1955; Sosa-Martinez u. Lennette 1955; Wildy u. Holden 1955; Balducci, Tyrrell u. Stuart-Harris 1956; Vivell, Hitzig u. Cremer 1957; Lippelt u. Söltz-Szöts 1959; u. v. a.). Verwendet wurden sowohl die Flüssigkeiten als auch Membranextrakte aus dem infizierten Brutei.

Nach Nutzbarmachung der Gewebekultur für die Viruszüchtung wurden für die H.s.-Serologie auch Antigene aus Kaninchennieren-, Mäuseembryonal- oder FL (Amnion)-Zellen verwendet (McNair Scott, Brugoon, Coriell u. Blank 1954; Modi u. Tobin 1955; Balducci, Tyrrell u. Stuart-Harris 1956; Beale u. Hair 1956; Kaplan 1957; Lippelt u. Söltz-Szöts 1959; Schmidt, Lennette u. Shon 1960; u. a.).

Bis heute blieb die Frage unentschieden, ob mit diesen Antigenen reine Präparationen vorliegen und die gleichen oder vielmehr verschiedene Antikörper nachgewiesen werden. Mit ähnlichen Methoden wie beim Influenza-Virus wurde beim H.s.-Virus versucht, eine lösliche (S) von

einer virusgebundenen (V) Antigenkomponente zu trennen (Hayward 1949, 1950; Jawetz, Coleman u. Allende 1951; McNair Scott, Burgoon, Coriell u. Blank 1954; Balducci, Tyrrell u. Stuart-Harris 1956; Lippelt u. Söltz-Szöts 1959; Polley 1960; u. a.) und selektiv gegen diese einzelnen Antigenkomponenten gerichtete Antikörper nachzuweisen. Von den meisten Autoren wird über nur sehr niedrige Antikörpertiter gegen S-Antigene nach H.s.-Infektionen berichtet. Schmidt, Lennette u. Shon (1960) kamen auf Grund dieser und eigener Beobachtungen zu der Überzeugung, daß die Antigenität des H.s.-Virus an das infektiöse Elementarkörperchen oder zumindest an dessen (noch nicht infektiöse) Vorstufen gebunden ist. In scheinbarem Gegensatz hierzu stellten Jawetz, Coleman u. Allende (1951) fest, daß mit einem löslichen H.s.-Antigen nach überstandener Infektion eine Hautüberempfindlichkeitsreaktion ausgelöst werden kann. Und Lippelt u. Söltz-Szöts (1959) beobachteten im Meerschweinchenversuch, daß sich nach der Infektion mit geeigneten S-Antigenen hohe Antikörpertiter nachweisen lassen und diese in einem direkten Zusammenhang mit der Infektionsimmunität zu stehen scheinen.

Vielfach wird im Schrifttum der letzten Jahre festgestellt, daß Antigene aus dem bebrüteten Hühnerembryo zum Nachweis komplementbindender Antikörper besser geeignet seien als solche aus der Gewebekultur. Demgegenüber wird von anderen Autoren über gleichwertige Resultate mit Ei- und Gewebekulturantigenen berichtet (Literatur siehe oben).

An diese widersprechenden Angaben schließen sich unsere Untersuchungen an. Sie wurden mit dem Ziel durchgeführt, in Teilprobleme des komplexen Geschehens der Serologie bei der H.s.-Infektion Einblicke zu gewinnen und nach Möglichkeit einige der Widersprüche bisheriger Beobachtungen aufzuklären.

Zunächst ergab sich, daß in den gleichen Serumproben und jederzeit reproduzierbar mit Antigenen aus der Gewebekultur (Kaninchennierenepithelzellen) sehr viel höhere Titer komplementbindender Antikörper nachzuweisen sind als mit V- und S-Antigenen aus dem Brutei. Das Zellsubstrat, mit dem die Versuchstiere bei der Infektion gleichzeitig immunisiert wurden, kann als Ursache hierfür keine Rolle spielen. Durch entsprechende Kontrollen mit Leer-Antigenen ließ sich zeigen, daß die Tiere gegen Kaninchennierenzellen keine erfaßbaren Antikörper entwickelt hatten. Auch eine unterschiedliche Qualität der beiden Antigene ist als Ursache für die Titerdifferenzen im gleichen Serum auszuschließen. Die Präparate wurden nach den gleichen Gesichtspunkten und am selben Immunserum in Blocktitrationen ausgewertet. Dabei betrug der Titer der komplementbindenden Aktivität in Gegenwart von homologem Immunserum für das G-Antigen 1:32 und für das

V-Antigen 1:20. Auch eine Summation von V- und S-Komponenten im Gewebekulturantigen erscheint wenig wahrscheinlich. Die Erklärung für diese Befunde, die zu denen anderer Autoren im Gegensatz stehen, muß daher in anderen Fakten gesucht werden.

Der Titerverlauf von G- und V-Antikörpern ist nicht vollständig synchron. Zu einem Zeitpunkt, an welchem die G-Antikörper ihren Höhepunkt bereits überschritten haben, steigen die V-Antikörper noch an (vgl. Abb. 3). Diese Beobachtung könnte daran denken lassen, daß mit dem G-Antigen andere Antikörper erfaßt werden als mit der V-Präparation aus dem Brutei. Beide Immunkörper richten sich gegen Partialantigene des Virusteilchens; die Bildung des jeweils homologen Antikörpers hängt von dem Material ab, mit welchem die Versuchstiere infiziert bzw. immunisiert worden sind. Die Befunde von Anderson u. Kilbourne (1961) geben diesem Deutungsversuch eine Stütze. Die Autoren beobachteten eine kräftige Produktion neutralisierender Antikörper, wenn sie Mäuse mit inaktivierten H.s.-Präparationen aus Kaninchennierenzellen immunisierten. Nach Verimpfung von inaktiviertem Virus aus der Chorioallantoisflüssigkeit des bebrüteten Hühnerembryo bleibt ein solcher immunologischer Effekt aus. Auch bei diesen Versuchen *wirkte sich also das Ausgangsmaterial entscheidend auf das Immunisierungsergebnis aus.*

Die grundsätzliche Diskrepanz zu den Beobachtungen anderer Autoren (höhere Antikörpertiter mit V-Antigenen aus dem Brutei als mit G-Antigenen) findet hierdurch aber nur eine teilweise Erklärung. Zusätzlich müßte man annehmen, daß Antigene aus verschiedenen Gewebekulturen eine differente komplementbindende Qualität haben. Während beispielsweise Schmidt, Lennette u. Shon (1960) mit Hühnerembryonalzellen oder Lippelt u. Söltz-Szöts (1959) mit FL (Amnion)-Zellen arbeiteten, verwendeten wir Kaninchennierenepithelzellen, die sich nach allgemeiner Erfahrung zur Kultivierung von H.s.-Virus besonders gut eignen. Ein Vergleich mit den Verhältnissen der Polio-Komplementbindungsreaktion drängt sich auf, bei der Antigene aus Affennierenepithelzellen aus bisher unbekannten Gründen sehr viel schwächer antigen wirksam sind als solche aus Hela-Zellen (Müller u. Meer 1960; u. a.). Es sei aber betont, daß wir über eigene Erfahrungen mit H.s.-Antigenen aus FL- oder Hühnerembryonalzellen nicht verfügen. Wir können nur sagen, daß sich uns G-Antigene aus Hela-Zellen in orientierenden Vorversuchen nicht so gut bewährt haben wie diejenigen aus Kaninchennierenzellen.

Unsere Experimente, eine Differenzierung von V- und S-Antikörpern mit den entsprechenden Antigenpräparationen aus dem Brutei vorzunehmen, waren nicht besonders erfolgreich und decken sich weitgehend mit den schon von McNair Scott, Burgoon, Coriell u. Blank

(1954) mitgeteilten Befunden. Der während des Versuchs beobachtete Verlauf von V- und S-Antikörpern war weitgehend parallel; die Titer der V-Antikörper lagen im Durchschnitt nur geringgradig über denen der S-Antikörper. Auch bei der Verwendung von Äther-behandelten S-Antigenen aus dem Brutei, die im Gegensatz zu den Präparationen von Wildy u. Holden (1955) sowie von Schmidt, Lennette u. Shon (1960) sicher frei von infektiösen Viruspartikeln waren, wurde keine größere Titerdifferenz zwischen V- und S-Antikörpern im gleichen Serum festgestellt. Nach dem Ergebnis dieser Versuche ist es nicht möglich, aus der Höhe des S-Antikörpertiters auf eine Infektionsimmunität zu schließen. Eine verbindliche Klärung der Frage nach dem Vorkommen und der immunologischen Bedeutung von S-Antikörpern ist unseres Erachtens nur möglich, wenn man neben reinen Antigenpräparationen Immunseren zur Verfügung hat, die jeweils nur eine der beiden möglichen Antikörperkomponenten enthalten. Über entsprechende Befunde ist uns aus dem Schrifttum nichts bekannt. Uns selbst gelang es bisher nicht, monovalente Immunseren (Anti-V bzw. Anti-S) gegen die entsprechenden H.s.-Antigenkomponenten herzustellen.

Aus Versuchen von Sosa-Martinez u. Lennette (1955) sowie Schmidt, Lennette u. Shon (1960) war bekannt, daß der Infektionstiter einer Antigenpräparation der komplementbindenden Aktivität im Versuch mit homologem Immunserum parallel geht. Die von uns mit Äther-behandeltem G-Antigen erhobenen Befunde zeigen, daß *die Antigenität nicht an die Infektiosität des Virusteilchens gebunden ist.* Im Gegensatz zu anderen Autoren gelang es uns zwar nicht, das G-Antigen vollständig zu inaktivieren. Der Infektiositätsverlust durch die Ätherbehandlung war aber so groß, daß er sich im Ergebnis des Vergleichsversuches mit G- bzw. G-Ä-Antigenen hätte auswirken müssen, wenn Antigenität und Infektiosität in direkter Beziehung zueinander stehen. Tatsächlich erwiesen sich die mit den beiden Antigenpräparationen in den gleichen Serumproben ermittelten Antikörpertiter als identisch. Gegen die vorstehende Deutung des Versuchsergebnisses wäre mit Recht einzuwenden, daß unbekannt ist, welche Veränderungen beim H.s.-Virus während der Äthereinwirkung eintreten. Es ist durchaus denkbar, daß zwar eine Inaktivierung stattfindet, das antigene V-Material dabei aber vollständig erhalten bleibt. Insofern würden unsere Befunde nicht im Gegensatz zu den Feststellungen von Sosa-Martinez u. Lennette (1955) bzw. Schmidt, Lennette u. Shon (1960) stehen. Man könnte aber ebenso umgekehrt annehmen, daß in der Gewebekultur überwiegend S-Antigen gebildet wird und die Infektiosität nur von untergeordneter Bedeutung ist. Auch diese Frage wäre am einfachsten mit monovalenten Immunseren zu klären.

Für diagnostische und epidemiologische Untersuchungen mit H.-s. Antigenen schien uns die Frage von Bedeutung, in wieweit Unterschiede

in der Antigenstruktur einzelner Virusstämme in das Ergebnis der Komplementbindungsreaktion eingehen. Von Brown (1953) Womack u. Hunt (1954), Jawetz, Coleman u. Merrill (1954) sowie von Florman u. Trader (1947) war dieses Problem schon einmal bearbeitet worden. Die beobachteten Antigenunterschiede bei den jeweils untersuchten Virusstämmen waren nur gering. Wir prüften die Antikörperbildung gegen G-Antigene nach Immunisierung der Versuchstiere mit zwei verschiedenen Virusstämmen und fanden, daß die serologischen Ergebnisse im stammhomologen System *deutlich* besser waren als im -heterologen (vgl. Tab.3 und 4). So zeigten die mit dem *Thöres*-Stamm infizierten Meerschweinchen einen etwa um eine Zehnerpotenz höheren Titer komplementbindender Antikörper gegen ein *Thöres*-G-Antigen als Tiere, die mit dem Stamm *Derm* infiziert worden waren. Die Folgerung, der Stamm *Derm* sei ein schlechteres Antigen und die Titerdifferenz finde hierin ihre Erklärung, erwies sich als irrig. Denn wir fanden, daß mit dem Stamm *Derm* infizierte Tiere einen um etwa zwei Zehnerpotenzen höheren Antikörpertiter gegen das homologe als gegen das heterologe G-Antigen entwickelten. Die Beobachtungen der vorgenannten Autoren, die sich mit der gleichen Fragestellung beschäftigt haben, sind dahingehend zu ergänzen, daß *Unterschiede im Antigenmosaik bei verschiedenen H.s.-Virusstämmen beträchtlich sein und sich in der Komplementbindungsreaktion auswirken können.*

Nach dieser Feststellung sind alle Befunde diagnostischer und epidemiologischer Untersuchungen beim Menschen mit gewissen Einschränkungen zu beurteilen. In unseren Experimenten wurde der Stamm *Derm* verwendet. In der Komplementbindungsreaktion mit *Derm*-G-Antigen werden — das ergibt sich aus den vorstehenden Ausführungen — nur solche Antikörper nachgewiesen, die von Infektionen mit H.s.-Virusstämmen herrühren, welche mit dem Stamm *Derm* antigenverwandt sind.

Die bei zahlreichen Patienten mit klinisch unklaren neurologischen Krankheitsbildern (überwiegend Encephalitiden oder Meningitiden ungeklärter Ätiologie) durchgeführten serologischen Untersuchungen erwiesen sich als wenig ergiebig. Nur bei vier Fällen (vgl. Tab.5) konnte auf Grund eines vierfachen Titeranstieges in der Herpes-G-Komplementbindungsreaktion eine H.s.-Ätiologie der Erkrankung wahrscheinlich gemacht werden. Anamnestische Reaktionen im Gefolge anderer Infekte mit cerebralen Manifestationen waren jedoch nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen. So kann gefolgert werden, daß entweder der H.s.-Komplementbindungsreaktion mit G-Antigenen keine wesentliche diagnostische Bedeutung zukommt oder zentralnervöse Manifestationen des H.s.-Virus selten sind.

Epidemiologische Untersuchungen mit Herpes-G-Antigenen unterliegen hinsichtlich der Bewertung der mit ihnen erhobenen Befunde

den gleichen Einschränkungen. Im Schrifttum mitgeteilte Zahlen über die Durchseuchung verschiedener Bevölkerungsgruppen schwanken zwischen 36 und 100% (Literatur bei Vivell, Hitzig u. Cremer 1957; sowie bei Hermes 1962). Diese erheblichen Unterschiede in der Durchseuchung finden in Antigenunterschieden der Virusstämme eine jedenfalls teilweise Erklärung. Daß darüber hinaus aber auch soziale Faktoren eine Rolle spielen, kann keinem Zweifel unterliegen und ergibt sich eindeutig aus den Befunden von Burnet u. Williams (1939) sowie von Buddingh, Schrum, Lanier u. Guidry (1953).

In Abb. 4 werden unsere Ergebnisse aus dem Raum Nordrhein-Westfalen denen von Vivell, Hitzig u. Cremer (1957) aus dem badischen Raum gegenübergestellt. Die Durchseuchungskurven verlaufen in Abhängigkeit vom Lebensalter der untersuchten Personen ähnlich; für das Land Nordrhein-Westfalen sind die Durchseuchungsraten jedoch im allgemeinen niedriger als in Baden. Diese Unterschiede können durchaus echt sein. Es ist bekannt, daß bei gleicher Laboratoriumstechnik beispielsweise in Baden Adenovirusinfektionen sehr viel häufiger diagnostiziert werden als in unserem Einzugsgebiet (Maass 1961). Mit letzter Sicherheit ist aber nicht auszuschließen, daß die festgestellten Unterschiede in der H.s.-Durchseuchung methodisch bedingt sind.

Zusammenfassung

Herpes simplex-Antigene aus Kaninchennierenzellkulturen erwiesen sich zum Nachweis komplementbindender Antikörper bei der experimentellen Infektion des Meerschweinchens den V- und S-Antigenen aus dem bebrüteten Hühnerembryo als überlegen. Auf Grund des Titerverlaufs der verschiedenen Antikörper wird diskutiert, ob mit G-, V- und S-Antigenen des H.s.-Virus identische oder unterschiedliche Antikörper nachgewiesen werden, und ob das zur Infektion bzw. Immunisierung verwendete infektiöse Material die Bildung bestimmter, gegen einzelne Antigenkomponenten gerichteter Antikörper beeinflußt.

Eine Differenzierung zwischen V- und S-Antikörpern war bei der experimentellen H.s.-Infektion des Meerschweinchens wenig erfolgreich. Äther-behandeltes und natives Gewebekulturantigen zeigten in der Komplementbindungsreaktion Antikörper mit identischen Titern an. Damit wird gezeigt, daß Infektiosität und Antigenität nicht gekoppelt sind. Offen bleibt die Frage, ob durch die Ätherbehandlung des Antigens die V-Komponente betroffen wird oder ob vielmehr in der Gewebekultur überwiegend S-Antigen gebildet wird. Es wird darauf hingewiesen, daß diese und andere Fragen erst dann verbindlich beantwortet werden können, wenn monovalente Seren (Anti-V, Anti-S) zur Verfügung stehen und für solche Untersuchungen herangezogen werden können.

Zwischen zwei H.s.-Virusstämmen werden im gekreuzten Komplementbindungsversuch deutliche Unterschiede in der Antigenstruktur festgestellt. Auf die sich daraus für diagnostische und epidemiologische Untersuchungen mit menschlichen Seren ergebenden Konsequenzen wird hingewiesen.

Abschließend wird über diagnostische Untersuchungen mit einem G-Antigen bei menschlichen Erkrankungsfällen mit unklaren neurologischen Symptomen und über epidemiologische Erhebungen mit der Komplementbindungsreaktion und dem gleichen G-Antigen im Raume Nordrhein-Westfalen berichtet. Dabei ergibt sich, daß die Zahl der H.s.-Erkrankungsfälle mit zentralnervöser Symptomatik selten oder der diagnostische Wert der H.s.-Komplementbindungsreaktion nur als gering zu veranschlagen ist. In Übereinstimmung mit anderen Autoren wird gezeigt, daß analog den Verhältnissen bei anderen Virusinfektionen der größte Teil der Bevölkerung im Kindesalter als Folge einer stummen Auseinandersetzung mit dem H.s.-Virus Antikörper erwirbt.

Literatur

Anderson, W. A., and E. D. Kilbourne: Immunization of mice with inactivated herpes simplex virus. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **107**, 518 (1961).

Balducci, D., D. A. J. Tyrell and C. H. Stuart-Harris: Complement fixing antigens of herpes simplex virus. Arch. ges. Virusforsch. **7**, 28 (1956).

Beale, A. J., and H. C. Hair: Rapid diagnosis of the herpetic variety of Kaposi's varicelliform eruption by tissue culture methods. Canad. med. Ass. J. **74**, 443 (1956).

Brand, G., u. F. Müller: Vergleichende Untersuchungen zur Herstellung von Antigenen für die Influenza-Komplementbindungsreaktion. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **139**, 421 (1954).

Brown, J. A. H.: Studies on the antigenic structure of herpes simplex virus. Brit. J. exp. Path. **34**, 290 (1953).

Buddingh, G. J., D. J. Schrum, I. C. Lanier and D. J. Guidry: Studies of the natural history of herpes simplex infections. Pediatrics **11**, 595 (1953).

Burnet, F. M., and S. W. Williams: Herpes simplex. Med. J. Aust. **26**, 637 (1939).

Dascomb, H. E., C. V. Adair and N. Rogers: Serologic investigations of herpes simplex virus infections. J. Lab. clin. Med. **46**, 1 (1955).

Dudgeon, J. A.: A complement fixation test for herpes simplex infections. J. clin. Path. **3**, 239 (1950).

Florman, A. L., and F. W. Trader: Comparative study of pathogenicity and antigenicity of four strains of herpes simplex. J. Immunol. **55**, 263 (1947).

Fowler, M.: The demonstration of complement fixing antibodies to herpes febrilis virus. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. **28**, 339 (1950).

Gajdusek, D. C., M. L. Robbins and F. C. Robbins: Diagnosis of herpes simplex infections by the complement fixation test. J. Amer. med. Ass. **149**, 235 (1952).

Halonen, P.: Investigations on the virus of herpes simplex. The herpes simplex complement fixation test and its use in the study of herpes antibodies. Ann. Med. exp. Fenn. **33**, Suppl. 9 (1955).

Hayward, M. E.: Serological studies with herpes-simplex-virus. Brit. J. exp. Path. **30**, 520 (1949).

Hayward, M.E.: Serological diagnosis of herpes simplex infections. Lancet **1950 I**, 856.

Hermes, K.: Untersuchungen zur Serologie der Herpes simplex-Infektion. Inaug.-Diss. Düsseldorf 1962.

Hoyle, L.: Structure of the influenza virus. The relation between biological activity and chemical structure of virus fractions. J. Hyg. (Lond.) **50**, 229 (1950).

Jawetz, E., V. Coleman and M. F. Allende: Studies on herpes simplex virus. II. A soluble antigen of herpes virus possessing skinreactive properties. J. Immunol. **67**, 197 (1951).

Jawetz, E., V. Coleman and E. R. Merrill: Immunological differences among herpes simplex viruses. Fed. Proc. **13**, 498 (1954).

Kaplan, A. S.: A study of the herpes simplex virus-rabbit kidney cell system by the plaque technique. Virology **4**, 435 (1957).

Lief, F., and W. Henle: Studies on the soluble antigen of influenza virus. I. The release of S antigen from elementary bodies by the treatment with ether. Virology **2**, 753 (1956).

Lippelt, H.: Persönliche Mitteilung (1961).

Lippelt, H., u. J. Sölte-Szöts: Serologische Studien zum Herpes-simplex-Problem. Arch. ges. Virusforsch. **9**, 127 (1959).

Maass, G.: Persönliche Mitteilung (1961).

McNair Scott, T. F., C. F. Burgoon, L. L. Coriell and H. Blank: The growth curve of thr virus of herpes simplex in rabbit corneal cells grown in tissue culture with parallel observations on the development of the intranuclear inclusion body. J. Immunol. **71**, 385 (1954).

Müller, F.: Quantitative Untersuchungen über den direkten und indirekten fluoreszenz-serologischen Nachweis der Komplementbindung an Enterovirus-Antikörper-Komplexe. Arch. ges. Virusforsch. **11**, 400 (1961).

Müller, F., u. U. Meer: Untersuchungen über den diagnostischen Wert der Komplementsbindungsreaktion mit Poliovirus-Antigenen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 50 (1960).

Polley, J. R.: Preparation of a stable non-infective complementfixing antigen for herpes simplex. Canad. J. Microbiol. **6**, 515 (1960).

Remlinger, P., et J. Bailly: Contribution à l'étude du virus herpetique. (Souche Marocaine.) Ann. Inst. Pasteur **41**, 1314 (1927).

Schmidt, N. J., E. H. Lennette and C. W. Shon: A complement-fixing antigen for herpes simplex derived from chick-embryo tissue cultures. Amer. J. Hyg. **72**, 59 (1960).

Slavin, H. B., and G. P. Berry: Studies of herpetic infection in mice. J. exp. Med. **78**, 315 (1943).

Sohier, R., M. Peillard, X. Challut et Y. Chardonnet: La réaction de fixation de complément. Antigènes préparés à partir des liquides amniotiques et allantoiques infectés. Ann. Inst. Pasteur **89**, 489 (1955).

Sosa-Martinez, J., and E. H. Lennette: Studies on a complement fixation test for herpes simplex. J. Bact. **70**, 205 (1955).

Vivell, O., W. H. Hitzig u. H. J. Cremer: Zur Klinik, Diagnose und Epidemiologie der Herpes simplex Infektionen. Helv. paediat. Acta **12**, 127 (1957).

Weisse, K.: Die Herpes simplex-Virus-Infektionen. Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. **14**, 390 (1960).

Wildy, P., and H. F. Holden: The complement fixing antigen of herpes simplex. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. **32**, 621 (1955).

Womack, C. R., and B. P. Hunt: Serological differences in strains of herpes-simplex virus. Science **120**, 227 (1954).

Priv.-Doz. Dr. Ferdinand Müller,
4041 Norf/Neuß, Gartenstraße 81

Zeitschrift f. Hygiene 148, 433—444 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. W. Brauss)

Sh. scholtensii und Sh. manolovii — zwei zur Untergruppe D zu stellende provisorische Shigella-Typen

Von
Wolfgang Stenzel

(Eingegangen am 6. April 1962)

Die zwischen E. coli und Shigella bestehende enge Verwandtschaft, welche ihren objektiven Ausdruck in der weitgehenden genetischen Homologie beider Keimgruppen findet (Luria u. Burrous 1957; Stenzel 1961), macht, vom Standpunkt des reinen Systematikers aus gesehen, jeden Versuch einer taxonomischen Aufteilung der Coli-Shigella-Gruppe zu einem Willkürakt. Die Abgrenzung einer taxonomischen Einheit Shigella erhält ihre Berechtigung nur aus dem Umstand, daß gewisse unbewegliche und biochemisch wenig aktive Vertreter der Gruppe Dysenterie verursachen können, eine taxonomische Sonderstellung dieser Typen also aus medizinisch-mikrobiologischen Gründen von Interesse ist.

Da die konventionellen Regeln eine Gattungs- und Species- (bzw. Gruppen- und Untergruppen-)Definition nach kulturell-biochemischen Eigenschaften verlangen, die Humanpathogenität der Ruhrerreger im übrigen im Einzelfall auch schwer zu objektivieren ist, basiert die derzeitig gegebene Definition der Shigella-„Gruppe" formal ausschließlich auf kulturell-biochemischen Merkmalen (Enterobacteriaceae Subcommittee 1958a). Trotzdem wurden aber nur als Ruhrerreger bekannte Typen in die taxonomische Einheit Shigella aufgenommen (Enterobacteriaceae Subcommittee 1958b), die Enteropathogenität somit stillschweigend als übergeordnetes Kriterium der Shigellen anerkannt. De facto wurden also alle bekannten Dysenterieerreger zu einer Shigella-Gruppe zusammengeschlossen, ihre biochemischen Leistungen als mit der Gruppendefinition kompatibel erklärt und alle übrigen in der Coli-Shigella-Gruppe vorkommenden biochemischen Aktivitäten zu Ausschlußkriterien erhoben. Aus dieser Grundkonzeption folgt, daß neu aufgefundene Ruhrerreger, sofern ihre Erregernatur wirklich gesichert ist und ihr kulturell-biochemisches Gesamtverhalten nicht zu sehr aus dem Rahmen der herkömmlichen Definition fällt, nötigenfalls eine Erweiterung der biochemischen — als der abgeleiteten — Definition der Shigella-Gruppe fordern.

Die serologischen Merkmale eines Stammes sind zwar wichtiger Bestandteil der Typdefinition, erlauben aber keinerlei Schlußfolgerungen für oder gegen die Gattungs- bzw. Gruppen-Zugehörigkeit. So sind die u.a. von Kauffmann (1949), Frantzen (1950a, 1950b) und Ewing et al. (1950) hervorgehobenen engen serologischen Beziehungen zwischen den Alkalescens-Dispar-Typen und E. coli ohne jede Beweiskraft, da, wie Ewing (1953), Rauss u. VerténYi (1959) und viele andere Autoren zeigten, auch zwischen Shigella und E. coli engste serologische Verflechtungen bestehen.

Es liegt in der Natur der Sache, daß Berichte über die Enteropathogenität eines mutmaßlichen Ruhrerregers häufig stark subjektiv gefärbt sind. Andererseits können auch anerkannte Dysenterieerreger zumindest ebenso häufig von gesunden wie

von erkrankten Personen isoliert werden. Unter diesen Umständen kommt den neuerdings entwickelten tierexperimentellen Methoden, mittels derer die Schleimhautpathogenität shigellaverdächtiger Keime objektiviert werden kann, außerordentliche Bedeutung zu: Die Parallelbeziehungen zwischen Augen- und Harnblasenpathogenität beim Meerschweinchen einerseits und Darmpathogenität beim Menschen andererseits sind für die Keime der Coli-Shigella-Gruppe bereits durch so viele voneinander unabhängige Untersuchungen erhärtet worden (SERÉNY 1955, 1957, 1960; SZTURM-RUBINSTEIN et al. 1957; MANOLOV 1957; GEKKER et al. 1957; SIROKO 1958; SANTARENKO 1958; PIÉCHAUD et SZTURM-RUBINSTEIN 1959; STENZEL 1960, 1962; MACKEL et al. 1961), daß das tierexperimentelle Verhalten — insbesondere die Keratoconjunctivitis shigellosa — zum kardinalen Kriterium der Shigellen erhoben und die Klassifikation zweifelhafter Stämme nach dem Ausfall dieser Teste vorgenommen werden sollte. Es muß hier allerdings darauf hingewiesen werden, daß alte Sammlungsstämme ihre Virulenz meist irreversibel eingebüßt haben und somit nicht mehr zu beurteilen sind.

Im Rahmen eines umfangreicheren Programms haben wir nun zwei shigellaähnliche Serotypen untersucht, die zur Zeit noch als zu E. coli gehörig angesehen werden. Beide erwiesen sich als tierpathogen, für beide ist die Humanpathogenität gesichert, und beide weisen überdies auch kulturell-biochemisch enge Beziehungen zur Shigella-Gruppe, insbesondere der Untergruppe D, auf.

Wir glauben, daß diese beiden Typen — 792 („Katwijk") und 147 — in die Shigella-Gruppe aufgenommen werden sollten und daß die gegenwärtig gültige Definition der Shigella-Gruppe einer Revision unterzogen werden muß. Die Eigenschaften der beiden Erreger und unsere Stellungnahme zu ihrer Klassifikation sind im einzelnen in den folgenden Kapiteln abgehandelt.

Material und Methoden

Zur Untersuchung gelangten die anaerogenen Stämme Sh. scholtensii (SCHOLTENS), 22842/50, 1139/51 und 10720/53 (SEELIGER), Ca/792 (CEFALÙ u. GULLOTTI), 2492/61, 10960/61, 10987/61, 324/62 und 575/62 (STENZEL) sowie die mit diesen serologisch identischen, aber gasbildenden Stämme V 2788/53 (SEELIGER) und E 1073(z) (TAYLOR).

Weiterhin wurden untersucht die Stämme 145/46, 302/53, 12/55, 201/59, 457/59, 459/59 und 251/61 (CARPENTER), „Shigella 13" (MANOLOV) und 12545/61 (STENZEL).

Lysindecarboxylase-Bestimmungen nahmen wir im Ninhydrin-Test nach CARLQUIST (1956) vor, benutzten jedoch als Medium eine 1%ige Lösung des handelsüblichen Caseinhydrolysats „Aminovit" der Fa. Boehringer, Mannheim.

Schwefelwasserstoffbildung wurde auf Kligler- und Christensen-Medium (zehntägige Beobachtung) und mittels Bleiacetatpapier über Glucose-Peptonwasser (Ablesung nach 48 Std) nachgewiesen.

Trimethylaminoxyd-Reduktion wurde im Medium von WOOD u. BAIRD (1943), jedoch mit Ablesung bereits nach 24 Std (WEIL u. BLACK 1944) geprüft.

Den Eijkman-Test zur Shigella/Coli-Differentialdiagnostik (STUART et al. 1942; STUART u. RUSTIGIAN 1943) modifizierten wir auf folgende Weise: Ein auf 45° vorgewärmter Kligler-Schrägagar wurde mit einer 4 mm-Öse voll 18 Std bebrüteter Kulturbouillon auf Schrägfläche und im Stich beimpft und zusammen mit Kontrollkulturen verschiedengradig gehemmter bzw. ungehemmt wachsender Keime 2 Tage

lang bei 45° im Brutschrank gehalten. Keime vom Colityp bewuchsen unter diesen Bedingungen die Schrägfläche in dichtem Rasen und den Stichkanal deutlich unter Säuerung des Hochschichtanteils. Paradysenterie-Stämme wurden vollständig gehemmt und Stämme von Sh. sonnei zum Teil vollständig, zum Teil auch relativ gehemmt: Die relativ gehemmten Stämme wuchsen auf der Schrägfläche in Einzelkolonien oder in zartem Rasen, bewuchsen nicht den Stichkanal und säuerten nur die Oberfläche des Kligler-Schrägagars.

Colitypisches Wachstum wurde als +, relativ gehemmtes als (+) und vollständig gehemmtes als 0 protokolliert.

Christensen-Citrat-Agar stellten wir nach den Angaben von Edwards et al. (1956) her.

Alle übrigen biochemischen Untersuchungen wurden in nach Kauffmann (1954) standardisierten Medien nach den von diesem gegebenen Richtlinien vorgenommen. Ammonium-Substrate verwendeten wir in ihrer flüssigen Form. Die Citrat- und d-Tartrat-Verwertung im Medium nach Kauffmann u. Petersen (1956) wurde nach 14tägiger Bebrütung durch Zugabe von Bleiacetat geprüft.

Zum Tierversuch zogen wir jeweils zwei weibliche Meerschweinchen heran: Wir instillierten 1 ml 24stündige Kulturbouillon in die vorher entleerte Harnblase und infizierten die gleichen Tiere zusätzlich mit einer Öse dichten Kulturmaterials am Auge. Einzelheiten können den Arbeiten von Serény (1960) und Stenzel (1960) entnommen werden.

Untersuchungen auf Gewebs-Kreuzimmunität wurden folgendermaßen vorgenommen: Mit einem Sh. flexneri 2- und dem Probanden-Stamm wurden jeweils vier Meerschweinchen an beiden und vier Meerschweinchen an einem Auge infiziert. Sobald die sich entwickelnde Keratoconjunctivitis abgeheilt war, wiederholten wir die Keiminoculationen, und zwar so lange, bis vollständige oder weitgehende homologe Gewebsimmunität bestand. Die beidseitig immunisierten Tiere wurden nun an einem Auge mit dem homologen, am anderen mit dem heterologen, die einseitig immunisierten an beiden Augen mit dem heterologen Stamm infiziert. Absolute Kreuzimmunität ließ sich am besten an Hand der doppelseitig vorbehandelten, relative an Hand der einseitig immunisierten Tiere darstellen.

Sh. scholtensii. Scholtens (1940) isolierte 1939 bei einer Gastroenteritis-Epidemie einen unbeweglichen, anaerogenen, verzögert Lactose spaltenden Enterobacteriaceen-Stamm, der im Serum von 14 der 20 Erkrankten mit Titern zwischen 1:15 und 1:260 agglutinierte. Er klassifizierte diesen Stamm als neuen Shigella-Serotyp und benannte ihn in Sh. scholtensii.

Seeliger (1952, 1954) züchtete später drei Stämme des Scholtensschen Sero-Biotyps (22842/50, 1139/51 und 10720/53) aus Stühlen Ruhrkranker an und wies nach, daß auch ein weiterer, in der Zwischenzeit von Cefalù u. Gullotti (1953) beschriebener und von diesen als neuer Boyd-Serotyp angesehener Stamm Ca/792 mit dem Scholtensschen serologisch identisch war (Seeliger 1954). Eingehende serologische Untersuchungen dieser, von Seeliger nach ihrem ersten Fundort als „Katwijk-Typen" bezeichneten Keime zeigten, daß sie weiterhin antigenidentisch mit den aerogenen E. coli-Kulturen V 2788/53 (Seeliger) und E 1073(z) (Taylor) waren und überdies enge serologische Beziehungen zu den E. coli-O-Gruppen 28 und 42 aufwiesen (Seeliger 1954). Aus diesem Grunde und

wegen ihrer ausgeprägten biochemischen Aktivität wurden die Katwijk-Stämme von Seeliger (1952, 1954) und Ewing et al. (1958) als Subserotypen von O 42 bzw. O 28 zu E. coli gestellt.

Vor allem die von Seeliger gegebenen detaillierten Krankengeschichten, die auf einen echten Dysenterie-Erreger hinwiesen, veranlaßten uns, das Problem der Katwijk-Typen erneut aufzugreifen.

Die uns von Prof. Seeliger freundlicherweise überlassenen alten Kulturen verursachten zwar im Tierversuch keine Keratoconjunctivitis mehr, doch löste einer der Stämme (10720/53) regelmäßig eine Cystitis aus, die sich von der typischen Harnblasenshigellose nur durch ihre ausgeprägte Spontanheilungstendenz unterschied.

Im Laufe der Jahre 1961/62 konnten wir nun selbst fünf Stämme (2492/61, 10960/61, 10987/61, 324/62 und 575/62) isolieren, deren biochemisches Verhalten mit dem der Katwijk-Typen übereinstimmte und die in einem gegen Seeligers Stamm 22842/50 gerichteten Serum bis zum Endtiter agglutinierten. Die serologische Identität der Stämme 22842/50 und 2492/61 wurde durch Kreuzabsorption gesichert.

Die Kulturen 324/62 und 575/62 stammten von ruhrkranken Erwachsenen, Kultur 10960/61 von einem dyspeptischen Säugling. Kultur 2492/61 wurde bei einem gesunden Keimträger, Kultur 10987/61 bei einem unklaren fieberhaften Erkrankungsfall ohne Darmbeteiligung isoliert.

Die Gruber-Widalsche Reaktion mit gekochtem Antigen war bei den Stämmen 10960/61 und 324/62 im 1:25 verdünnten Patientenserum negativ; Stamm 575/62 zeigte dagegen einen geringen Agglutinationstiter von 1:50.

Unsere fünf frisch isolierten Katwijk-Stämme lösten alle im Tierversuch die für Shigellen typische Keratoconjunctivitis und Harnblasenruhr aus. Weiterhin ließ sich am Meerschweinchenauge Gewebs-Kreuzimmunität (Manolov 1957; Serény 1958; Szturm-Rubinsten u. Piéchaud 1958) zwischen einem anerkannten Shigella- und unserem Katwijk-Stamm 2492/61 nachweisen: Die Vorbehandlung mit Sh. flexneri 2 führte zu absoluter Immunität gegenüber Stamm 2492/61, die Vorbehandlung mit dem Katwijk-Stamm zu relativer Immunität gegenüber Sh. flexneri 2.

Biochemisch stellten die zehn uns zur Verfügung stehenden anaerogenen Stämme vom Katwijk-Typ eine relativ homogene Einheit dar, deren Variationsbreite das für einen Shigella-Serotyp übliche Ausmaß nicht überschreitet:

Drei der Stämme griffen Lactose prompt, sechs verzögert zwischen dem 2. und dem 22. Tag und einer (Ca/792) innerhalb der vierwöchigen Beobachtungszeit nicht an. Maltose wurde von Ca/792 verzögert, von allen übrigen Stämmen prompt fermentiert. Im Ammonium-Glucose-Medium wuchsen fünf Stämme nicht, zwei verzögert und drei prompt. Christensen-Citrat-Agar wurde nur von Ca/792 stark verzögert (um den 7. Tag) alkalisiert, Trimethylaminoxyd von allen Stämmen bis auf Ca/792 reduziert. Bei 45° wurden fünf Stämme vollständig, vier relativ und einer (Stamm Scholtens) nicht gehemmt.

Das für die Großzahl der Alkalescens-Dispar-Typen ungewöhnliche Fehlen einer Aktivität gegenüber Mucat und Lysin und die einem Teil der Katwijk-Kulturen eigene Auxotrophie und 45°-Empfindlichkeit weisen auch auf biochemisch enge Beziehungen zur Shigella-Gruppe hin.

Die biochemische Aktivität der aerogenen Stämme (siehe Tabelle) fällt dagegen völlig aus dem Rahmen der Leistungen des gaslosen Katwijk-Typs und weist erstere als typische Vertreter der E. coli-Gruppe aus, die nicht als aerogene Varianten der Sh. scholtensii gelten können.

Als kulturelle Besonderheit der Katwijk-Stämme imponierte die ausgeprägte Neigung zur Wuchsform-Dissoziation, deren Bild rein morphologisch dem bei Sh. sonnei anzutreffenden entsprach. Obwohl die Flachformen häufig auch in physiologischer Kochsalzlösung spontan ausflockten, blieben sie in 0,2%iger NaCl-Lösung suspensionsstabil und wurden in diesem Medium durch das homologe Immunserum bis zum Endtiter agglutiniert. Der S/R-Formenwechsel ging demnach also nicht mit einer O_I/O_{II}- bzw. O/o-Variation einher.

Die von Seeliger hervorgehobene Hämolyse auf 10%igem Hammelblutagar kam auch bei uns gelegentlich zur Beobachtung, war aber vergleichsweise wenig ausgeprägt und wechselte von Nährbodencharge zu Nährbodencharge stark.

Da die Katwijk-Stämme nicht nur die spezifische Human- und Tierpathogenität sowie das gewebsimmunogene Prinzip mit den anerkannten Shigellen teilen, sondern auch kulturell-biochemisch charakteristische Shigella-Merkmale aufweisen, halten wir eine Aufnahme des anaerogenen Katwijk-Typs (Serotyp Ca/792) in die Shigella-Untergruppe D unter der provisorischen Benennung in Sh. scholtensii für gerechtfertigt.

Sh. manolovii. Ewing et al. (1958) berichteten im Zusammenhang mit anderen intermediären Stämmen über einen Serotyp 147, dessen Prototyp bereits 1944 in Italien isoliert worden war. Carpenter (1961) sammelte in den Jahren 1946—1961 eine größere Anzahl von Kulturen des gleichen — und von ihr als Serotyp 145/46 bezeichneten — Keimes, die meist aus Stühlen Ruhrkranker angezüchtet worden waren. Manolov (1959) schließlich isolierte bei klinisch typischen Ruhrerkrankungen fünf Stämme, die sich als serologisch identisch mit Serotyp 147 bzw. 145/46 erwiesen, und benannte sie in „Shigella 13". Wir selbst fanden einen solchen Stamm (12545/61) im Stuhl eines an einer fieberhaften Erkrankung ohne Darmbeteiligung leidenden Kindes.

Ewing et al. (1958) klassifizierten den Serotyp 147 auf Grund seiner ausgeprägten Aktivität und seiner serologischen Beziehungen zur E. coli-O-Gruppe 25 als Subserotyp von E. coli O 25 bzw. Alkalescens-Dispar 02. Carpenter (1961) sieht diesen Keim zwar als unzweifelhaften und der Shigella-Gruppe nahestehenden Dysenterie-Erreger an, spricht sich aber aus formalen Gründen — einige ihrer Stämme spalteten Salicin und alle alkalisierten Christensen-Citrat-Agar — gegen eine Eingliederung in die Shigella-Gruppe aus. Manolov (1959) dagegen wies nach, daß seine eigenen und einige von Carpenter überlassene Vergleichsstämme am

Meerschweinchenauge eine typische Keratoconjunctivitis shigellosa auslösten und daß darüber hinaus zwischen Serotyp 147 und anerkannten Shigellen Gewebs-Kreuzimmunität bestand. Trotz gewisser biochemischer Atypien seiner Stämme, wie geringe H_2S-Bildung und Citratverwertung

Tabelle

	Sh. manolovii	Sh. scholtensii	V 2788/53	E 1073 (z)
Adonit	0	0	0	0
Dulcit	0	0	⊕[2]	⊕
Sorbit	+	+	+	+
Mannit	+	+	+	+
Inosit	0	0	0	0
Arabinose	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+
Rhamnose	+/+[v]	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Gas aus Glucose	0	0	⊕	⊕
Ammonium-Glucose	0/+[v]	0/+[v]/+	+	+
Sorbose	0	0	0	⊕
Maltose	+	+/+[v]	+	+
Lactose	0*	+[v]/+/0	+	+
Saccharose	0*	0	0	⊕[2]
Salicin	0/+[v]	0	⊕[3]	⊕
Mucat	0	0	⊕	⊕
d-Tartrat	0	0	0	0
Christensen-Citrat	+[v]	0/(+)[v]	⊕	⊕
Pepton-Citrat	0	0	0	0
Ammonium-Citrat	0	0	0	0
Methylrot-R.	+	+	+	+
Voges-Proskauer-R.	0	0	0	0
Gelatine	0	0	0	0
Indol	+/0	+	+	+
H_2S (Agar)	0	0	+[7]	0
H_2S (Indicatorpapier)	(+)/+	(+)/+/0	++	0
Harnstoff	0	0	0	0
Lysindecarboxylase	0	0	⊕	⊕
Nitrat-Reduktion	+	+	+	+
Trimethylaminoxyd-Reduktion	+	+/0	+	+
45°-Wachstum	(+)/+/0	0/(+)/+	+	+
Beweglichkeit	0	0	0	⊕

+ = prompt positiv; +[3] = positiv am 3. Tag; +[v] = verzögert positiv; (+) = schwach positiv; +/+[v]/0 = meist prompt, seltener verzögert positiv, selten negativ.

* Von anderen Untersuchern wurden auch verzögert fermentierende Stämme beobachtet.

im Christensen-Medium, empfahl MANOLOV deshalb die Aufnahme des Serotyps in eine neue Shigella-Untergruppe E.

Neun Stämme des Serotyps 147 wurden von uns biochemisch (siehe Tabelle) und tierexperimentell untersucht.

Zwei der Stämme fermentierten Salicin nach 2–3 Tagen, alle alkalisierten Christensen-Citrat-Agar am 2. Tag. Schwefelwasserstoff-Bildung ließ sich auf Eisenagar nie nachweisen, doch wurde Bleiacetat-Papier über Glucose-Peptonwasser in etwa demselben Ausmaß geschwärzt wie durch Kulturen coliformer Keime. Die 45°-Empfindlichkeit war weit weniger ausgeprägt als die bei Sh. scholtensii vorgefundene; absolute Hemmung sahen wir nur bei einem der Stämme. Andere biochemische Merkmale entsprachen dagegen der Verhaltensweise typischer Shigellen; so wurden Mucat und Lysin nie angegriffen, und fünf der Stämme erwiesen sich als auxotroph, während die übrigen vier erst zwischen dem 7. und dem 30. Tag Glucose im Ammonium-Medium angriffen.

Im Tierexperiment lösten vier der Stämme typische Keratoconjunctivitis shigellosa und Harnblasenruhr aus.

Entsprechend den von uns in der Einleitung vorgebrachten Argumenten, halten auch wir es für angebracht, den Serotyp 147 in die Shigella-Gruppe aufzunehmen. Wir schlagen vor, ihn unter der Benennung als prov. Sh. manolovii in die Untergruppe D zu stellen. Die Rechtfertigung einer solchen Klassifizierung und die aus ihr für die Definition der Shigella-Gruppe erwachsenden Konsequenzen sollen im folgenden Kapitel diskutiert werden.

Zur taxonomischen Stellung der Serotypen 792 (Sh. scholtensii) und 147 (Sh. manolovii)

Einwände gegen eine Aufnahme in die Shigella-Gruppe können bei Serotyp 792 aus der Intensität seiner Schwefelwasserstoff-Bildung, die das für Shigellen typische Ausmaß überschreitet, sowie aus der verzögerten Alkalisierung von Christensen-Citrat durch einen der Stämme, bei Serotyp 147 aus der Schwefelwasserstoff-Bildung, der Alkalisierung von Christensen-Citrat und der bei einigen Stämmen vorliegenden Salicin-Aktivität erwachsen.

Die Citratverwertung vieler Keime, insbesondere auch solcher der E. coli-Gruppe, hängt weitgehend von der Zusammensetzung des Basismediums ab (Vaughn et al. 1950). Sie ist am schwächsten ausgeprägt in den Ammonium-Citrat-Nährböden nach Koser (1923, 1924) und Simmons (1926), nimmt deutlich zu in Peptonwassermedien (Brown et al. 1924/25; Kauffmann u. Petersen 1956) und erreicht ein Maximum im Christensen-Substrat (Christensen 1949). Citrat-Abbau durch Shigellen ist zwar auch im Christensen-Medium ungewöhnlich (Edwards u. Ewing 1955; Edwards et al. 1956; Enterobacteriaceae Subcommittee 1958a), doch beobachtete Kauffmann (1954) einen Sh. flexneri 1b-Stamm, welcher sogar in Peptonmedium Citrat verwerten konnte. Die Definition des Enterobacteriaceen-Subkomitees ist dementsprechend vorsichtig abgefaßt und schließt lediglich die Ammonium-Citrat verwertenden Keime aus der Shigella-Gruppe aus (Enterobacteriaceae Subcommittee 1958a).

Was die H_2S-Bildung anbelangt, so ist die Differenz zwischen E. coli und Shigella nur quantitativer Natur. Da einerseits die Nachweisempfindlichkeit weitestgehend von der Zusammensetzung des Testmediums und sogar von der dazu verwendeten Pepton-Charge abhängt (Tilley 1923a, 1923b; Myers 1920; Clarke 1953), andererseits den Stämmen beider Gruppen aber auch eine gewisse Streubreite in Hinblick auf die freigesetzte Schwefelwasserstoff-Menge eingeräumt werden muß, ist der Schwefelwasserstoff-Nachweis schwerlich dazu geeignet, innerhalb der Coli-Shigella-Gruppe als absolutes Ausschlußkriterium zu dienen. Wie zu erwarten,

liegen Berichte über H_2S-Bildung in üblichen Nachweismedien durch Stämme anerkannter Shigella-Serotypen bereits vor (TILLEY 1923b; FRIEWER u. SHAUGHNESSY 1944; NETER 1948; FLOYD 1954; EDWARDS u. EWING 1955); auch wir beobachteten einen Sh. sonnei-Stamm, der auf Kligler-Agar einer bestimmten Charge nach 4 Tagen H_2S bildete, auf anderen Ansätzen von Kligler-Medium aber keine Sulfidreaktion mehr gab.

Die Salicin-Spaltung zum Shigella-Ausschlußkriterium zu erheben (ENTEROBACTERIACEAE SUBCOMMITTEE 1958a), ist nicht korrekt, da einzelne Stämme der bereits anerkannten Sh. sonnei dieses Glykosid angreifen (ROELCKE 1943; SERÉNY 1959).

Sachliche Gründe gegen eine Miteinbeziehung der Serotypen 792 und 147 in die Shigella-Gruppe liegen somit nicht vor. Aus der gegenwärtig gültigen Shigella-Definition erwachsende formale Einwände gegen den Serotyp 147 sind nicht stichhaltig und weisen eher auf deren Revisionsbedürftigkeit hin.

MANOLOV (1959) empfahl, den Serotyp 147 — seine „Shigella 13" — in eine neue Untergruppe E zu stellen. Wir halten es dagegen für besser, wie Sh. scholtensii auch die prov. Sh. manolovii in die Untergruppe D aufzunehmen, deren Definition so oder so auf potentielles Salicin-Spaltungsvermögen ihrer Angehörigen erweitert werden muß. Die formale Forderung nach potentieller Lactose-Aktivität wird auch durch Sh. manolovii erfüllt, da andere Untersucher bei einzelnen Stämmen dieses Serotyps verzögerte Lactose-Spaltung beobachteten (EWING et al. 1958; CARPENTER 1961).

Zur Definition der Shigella-Untergruppe D und zur Nomenklatur der in ihr enthaltenen Typen

Wie bereits oben ausgeführt, halten wir es für angebracht, die Befähigung frisch isolierter Stämme, am Meerschweinchenauge Keratoconjunctivitis zu erregen, als conditio sine qua non mit in die Definition der Shigella-Gruppe zu übernehmen.

Weiterhin schlagen wir vor, die Definition der Untergruppe D auf alle diejenigen unbeweglichen und anaerogenen Serotypen der Coli-Shigella-Gruppe auszudehnen, deren Schleimhautpathogenität — objektivierbar durch den Keratoconjunctivalversuch — gesichert ist, bei denen aber ein nennenswerter Prozentsatz der Stämme Lactose und/oder Salicin angreift, insbesondere, wenn sie außerdem auch noch Christensen-Citrat alkalisieren, Mucat spalten, Lysin in einem im Ninhydrin-Test nachweisbaren Ausmaß decarboxylieren, H_2S in größeren Mengen freisetzen, Trimethylaminoxyd reduzieren und/oder bei 45° nicht oder nur wenig gehemmt werden, sofern es sich bei diesen Stämmen nicht um Varietäten bereits anerkannter Serotypen anderer Shigella-Untergruppen handelt.

Da nach den gegenwärtig gültigen Nomenklaturregeln die Shigella-Untergruppen wie Species behandelt werden, müßte bei Aufnahme weiterer Serotypen in die Untergruppe D Sh. sonnei als Sh. sonnei 1, die neu hinzukommenden Typen als Sh. sonnei 2, 3 usw. bezeichnet werden. Unglücklicherweise haben sich die Begriffe Sh. sonnei I und II aber bereits als Bezeichnungen für die beiden O-Formen des Kruse-Sonne-Keims eingebürgert, so daß ständige Verwechslungen des zweiten

Serotyps der Untergruppe D mit der zweiten Sonne-Form die Folge wäre. Diese Situation läßt es opportun erscheinen, die Typen der Untergruppe D umzubenennen, und es liegt nahe, hierfür den Metadysenterie-Begriff CASTELLANIS heranzuziehen und neu zu definieren.

CASTELLANI faßte eine Anzahl von Alkalescens-Dispar-Serotypen mit Sh. sonnei (B. ceylonensis A) in einer Metadysenterie-Gruppe zusammen. Die Definition dieser Gruppe wechselte im Laufe der Zeit stark, umfaßte aber schließlich nur noch solche Typen, die CASTELLANI — wohl meist zu Unrecht — für enteropathogen hielt (CASTELLANI 1929, 1932, 1933, 1951/52; CASTELLANI u. CHALMERS 1920; CASTELLANI u. DOUGLAS 1937).

Wir schlagen deshalb vor, die Serotypen der Untergruppe D mit der Bezeichnung Sh. metadysenteriae zu belegen und Sh. sonnei in Sh. metadysenteriae 1, die prov. Sh. scholtensii in Sh. metadysenteriae 2 und die prov. Sh. manolovii in Sh. metadysenteriae 3 umzubenennen.

Zusammenfassung

1. Auf Grund ihrer Darmpathogenität beim Menschen, ihrer Schleimhautpathogenität beim Versuchstier, ihres gewebsimmunologischen Verhaltens und gewisser kulturell-biochemischer Eigenschaften müssen die Serotypen 792 („Katwijk") und 147 („Shigella 13") in die Shigella-Untergruppe D gestellt werden. Für den Katwijk-Typ wird die provisorische Benennung in Sh. scholtensii, für Serotyp 147 die provisorische Benennung in Sh. manolovii vorgeschlagen.

2. Es wird weiterhin empfohlen, den Keratoconjunctivalversuch am Meerschweinchen als kardinales Kriterium mit in die Shigella-Definition einzubeziehen und die Definition der Untergruppe D auch auf Salicin spaltende Serotypen zu erweitern, insbesondere, wenn diese auch noch weitere geringfügige Atypien aufweisen.

3. Es wird zur Diskussion gestellt, die Typen der Untergruppe D in Sh. metadysenteriae umzubenennen.

Frau Dr. CARPENTER (Dysentery Reference Laboratory, London), Herrn Prof. SEELIGER (Hygiene-Institut der Universität Bonn) und Herrn Dr. MANOLOV (Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Sofia) sind wir für die Überlassung von Stämmen und wertvolle Hinweise zu großem Dank verpflichtet.

Literatur

BROWN, H. C., J. T. DUNCAN and T. W. HENRY: The fermentation of salts of organic acids as an aid to the differentiation of bacterial types. J. Hyg. (Lond.) **23**, 1 (1924/25).

CARLQUIST, P. R.: A biochemical test for separating paracolon groups. J. Bact. **71**, 339 (1956).

CARPENTER, K. P.: Persönliche Mitteilung (1961).

CASTELLANI, A.: "Metadysentery", with remarks on a chroinc type. Lancet **1929** II, 370.

CASTELLANI, A.: Die Klassifizierung der Dysenteriebazillen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **125**, 37 (1932).

Castellani, A.: A little-known type of chronic colitis (chronic metadysentery). J. trop. Med. Hyg. **36**, 109 (1933).

Castellani, A.: Some little known bacteria. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **157**, 74 (1951/52).

Castellani, A., et A. J. Chalmers: Sur la classification de certains groupes de bacilles aérobies de l'intestin humain. Ann. Inst. Pasteur **34**, 600 (1920).

Castellani, A., and M. Douglas: Biochemical characters and agglutinative reactions of the metadysentery bacilli. J. trop. Med. Hyg. **40**, 197 (1937).

Cefalù, M., e A. Gullotti: Un nuovo tipo di Shigella boydii Sierotipo provvisorio Ca/792. Nuovi Ann. ig. **4**, 237 (1953).

Christensen, W. B.: Hydrogen sulfide production and citrate utilization in the differentiation of the enteric pathogens and the coliform bacteria. Res. Bull. Weld Co. Health Dept., Greeley, Colo. **1**, 3 (1949); zit. nach Edwards et al. Amer. J. med. Technol. **22**, 28 (1956).

Clarke, P. H.: Hydrogen sulphide production by bacteria. J. gen. Microbiol. **8**, 397 (1953).

Edwards, P. R., and W. H. Ewing: Identification of Enterobacteriaceae. Minneapolis, Minn. 1955.

Edwards, P. R., M. A. Fife and W. H. Ewing: Newer biochemical methods in the recognation of Shigellae and Salmonellae. Amer. J. med. Technol. **22**, 28 (1956).

Enterobacteriaceae Subcommittee: Report of the Enterobacteriaceae Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Association of Microbiological Societies. Internat. Bull. bact. Nomenclature Taxonomy **8**, 25 (1958a).

Enterobacteriaceae Subcommittee: Supplement to the third report on the Shigella group. Internat. Bull. bact. Nomenclature Taxonomy **8**, 93 (1958b).

Ewing, W. H.: Serological relationships betwen Shigella and coliform cultures J. Bact. **66**, 333 (1953).

Ewing, W. H., R. W. Reavis and B. R. Davis: Provisional Shigella serotypes. Canad. J. Microbiol. **4**, 89 (1958).

Ewing, W. H., M. W. Taylor and M. C. Hucks: The Alkalescens-Dispar group. Publ. Hlth Rep. (Wash.) **65**, 1474 (1950).

Floyd, T. M.: Provisional Shigella boydii infestions in Egyptian children. J. Bact. **67**, 738 (1954).

Frantzen, E.: Biochemical and serological studies on Alkalescens and Dispar strains. Acta path. microbiol. scand. **27**, 236 (1950a).

Frantzen, E.: Further serological studies on Alkalescens and Dispar strains. Acta path. microbiol. scand. **28**, 103 (1950b).

Friewer, F., and H. J. Shaughnessy: Lead semisolid agar, a medium for use in the identification of the enteric group of bacteria. Amer. J. clin. Path. **14**, Techn. Sect. **8**, 1 (1944).

Gekker, V. D., J. A. Belaya and E. T. Melnik: Experimental keratoconjunctivitis as a model for the study of dysentery. J. hyg. epidem. microbiol. imm. (Prag) **1**, 70 (1957).

Kauffmann, F.: On the classification of the Enterobacteriaceae. Acta path. microbiol. scand. **26**, 879 (1949).

Kauffmann, F.: Enterobacteriaceae, 2. Aufl. Kopenhagen 1954.

Kauffmann, F., and W. Petersen: The biochemical group and type differentiation of Enterobacteriaceae by organic acids. Acta path. microbiol. scand. **38**, 481 (1956).

Koser, S. A.: Utilization of the salts of organic acids by the Colon-Aerogenes group. J. Bact. **8**, 493 (1923).

Koser, S. A.: Correlation of citrate utilization by members of the Colon-Aerogenes group with other differential characteristics and with habitat. J. Bact. **9**, 59 (1924).

Luria, S. E., and J. W. Burrous: Hybridization between Escherichia coli and Shigella. J. Bact. **74**, 461 (1957).

Mackel, D. C., L. F. Langley and L. A. Venice: The use of the guinea-pig conjunctivae as an experimental model for the study of virulence of Shigella organisms. Amer. J. Hyg. **73**, 219 (1961).

Manolov, D. G.: A study of some questions of pathogenicity and immunity in dysentery using experimental models of Shigella keratoconjunctivitis in guinea pigs. J. hyg. epidem. microbiol. imm. (Prag) **1**, 322 (1957).

Manolov, D. G.: A new type of the genus Shigella — "Shigella 13". J. hyg. epidem. microbiol. imm. (Prag) **3**, 184 (1959).

Myers, J. T.: The production of hydrogen sulphide by bacteria. J. Bact. **5**, 231 (1920).

Neter, E.: The genus Shigella and Shigellosis. Amer. J. dig. Dis. **15**, 213 (1948).

Piéchaud, D., et S. Szturm-Rubinsten: Pouvoir pathgène expérimental des bacilles dysentériques chez le cobaye. Ann. Inst. Pasteur **97**, 511 (1959).

Rauss, K., u. A. Vertényi: Ein coliformes Bakterium mit Sh. flexneri-verwandten Antigeneigenschaften. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **174**, 352 (1959).

Roelcke, K.: Die Kruse-Sonne-(E-) Ruhr. Bakteriologie, Serologie, Klinik und Epidemiologie. Stuttgart 1943.

Santarenko, I. V.: Ob atipicnych bakterijach dizenterijinoj gruppy. Z. Mikrobiol. (Mosk.) **4**, 91 (1958); zit. nach Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **170**, 289 (1959).

Scholtens, R. Th.: Een onbekend type dysenteriebacterie als oorzaak eener epidemie. Ned. T. Geneesk. **84**, 4613 (1940).

Seeliger, H.: Ein wenig bekannter Escherichia-Typ als wahrscheinliche Ursache ruhrähnlicher Erkrankungen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **135**, 526 (1952).

Seeliger, H.: Untersuchungen über die O-Antigene der Escherichia coli-Gruppen O 28, O 42 und des pathogenen „Katwijk"-Typs. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **139**, 55 (1954).

Serény, B.: Experimental Shigella keratoconjunctivitis. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **2**, 293 (1955).

Serény, B.: Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **4**, 367 (1957).

Serény, B.: Acquired natural immunity following recovery from keratoconjunctivitis shigellosa. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **5**, 343 (1958).

Serény, B.: Sh. sonnei cultures fermenting salicin. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **6**, 217 (1959).

Serény, B.: Keratoconjunctivitis shigellosa. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **178**, 325 (1960).

Simmons, J. S.: A cultural medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes group and for isolation of certain fungi. J. infect. Dis. **39**, 209 (1926).

Siroko, I. A.: Keratokonjunktivit u morskoj svink kak bioproba pri identifikaciji dizenterijinych bakteriji. Z. Mikrobiol. (Mosk.) **4**, 71 (1958); zit. nach Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **170**, 286 (1959).

Stenzel, W.: Untersuchungen über die Schleimhautpathogenität einiger Enterobacteriaceen-Gruppen im Bingelschen Versuch. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 123 (1960).

Stenzel, W.: Esch. coli-Shigella-Hybriden und ihre Schleimhautpathogenität. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 521 (1961).

Stenzel, W.: Die Schleimhautpathogenität der bakteriellen Ruhrerreger im Tierversuch. (In Vorbereitung 1962.)

Stuart, C. A., and R. Rustigian: Further studies on the Eikman reactions of Shigella cultures. J. Bact. **46**, 105 (1943).

Stuart, C. A., A. Zimmerman, M. Baker and R. Rustigian: Eijkman relationships of the coliform and related bacteria. J. Bact. **43**, 557 (1942).

Szturm-Rubinsten, S., et D. Piéchaud: Facteur kérato-conjonctival des Shigella. Ann. Inst. Pasteur **95**, 763 (1958).

Szturm-Rubinsten, S., D. Piéchaud et P. Thibault: Inoculation conjonctivale au cobaye de bacilles dysentériques. Ann. Inst. Pasteur **93**, 463 (1957).

Tilley, F. W.: Variations in hydrogen sulphide production by bacteria. J. Bact. **8**, 115 (1923a).

Tilley, F. W.: The relation between chemical composition of peptones and hydrogen sulphide production by bacteria. J. Bact. **8**, 287 (1923b).

Vaughn, R. H., J. T. Osborne, G. T. Wedding, J. Tabachnick, C. G. Beisel and T. Braxton: The utilization of citrate by Escherichia coli. J. Bact. **60**, 119 (1950).

Weil, W. J., and J. Black: Species differentiation within the genus Shigella by test for the reduction of trimethylamine oxide. J. Bact. **47**, 575 (1944).

Wood, A. J., and E. W. Baird: Reduction of trimethylamine oxyde by bacteria. 1. The Enterobacteriaceae. J. Fisheries Res. Board Canada **6**, 194 (1943).

Dr. W. Stenzel,
Hygiene-Institut der Universität Heidelberg, 69 Heidelberg, Thibautstraße 2

Zeitschrift f. Hygiene 148, 445—457 (1962)

Aus dem Bakteriologischen Laboratorium der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten in Hamburg (Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Schuchardt)

Über das Vorkommen von Neisserien bei einigen Tieren

Von

Ulrich Berger

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. April 1962)

Als Wirt aller saprophytischen wie parasitischen Neisserien galt bis vor wenigen Jahren so ausschließlich der Mensch, daß Pelczar, Hajek u. Faber (1949) annehmen durften, es sei ihnen die erste Isolierung eines derartigen Keimes von einem tierischen Wirt gelungen, nachdem sie eine Reihe einheitlicher, von allen bekannten Arten dieser Gattung abweichender Stämme von Meerschweinchen gezüchtet hatten. Er erhielt später den Namen *Neisseria caviae* (Pelczar 1953).

Aber schon im Jahre 1907 hatte Flexner mitgeteilt, daß gramnegative, offenbar aerobe Diplokokken auch auf den Nasenschleimhäuten von Katzen, Hunden und Affen vorkommen. Bitter u. Gundel (1925) fanden gramnegative Diplokokken, die sie auf Grund ihrer Koloniemorphologie zur „Catarrhalis-Gruppe" rechneten, auf der Rachenschleimhaut von Meerschweinchen. Einen hämolysierenden Keim von gleicher Morphologie und Färbbarkeit isolierte Gibbons (1929) aus Lymphdrüsenabscessen ebenfalls von Meerschweinchen. Dieser Diplococcus säuerte eine Reihe von Kohlenhydraten und erwies sich auch für Maus und Kaninchen pathogen. Von Hauduroy u. Mitarb. (1937) wurde er nach seinem Entdecker *Neisseria gibbonsi* genannt.

Nach *N. caviae* wurden dann noch zwei weitere neue Arten von Tieren isoliert. Lindquist (1960a) züchtete eine größere Zahl hämolysierender, nitritbildender Stämme von Keratoconjunctivitiden bei Schafen, die er *Neisseria ovis* nannte, und einen sehr ähnlichen, aber anhämolytischen Keim von der entzündeten Conjunctiva eines Pferdes (1960b). Wir selbst fanden, wiederum bei Meerschweinchen, einige Stämme einer als *Neisseria animalis* bezeichneten Art (Berger 1960), die als einzigen Zucker Saccharose verwertete und dadurch leicht von *N. caviae* abzugrenzen war.

Nach diesen Berichten darf man also annehmen, daß Keime der Gattung *Neisseria* auch bei Tieren nicht selten sind, und daß sie offenbar zu Arten gehören, die beim Menschen nicht vorkommen. Um etwas mehr darüber zu erfahren, versuchten wir, von der Rachenschleimhaut von Meerschweinchen, Kaninchen, Hunden und Katzen weitere derartige Stämme zu isolieren, ihre Eigenschaften kennenzulernen und sie in das System einzuordnen.

Methoden[1]

Rachenabstriche von 10 Katzen, 20 Hunden und einer größeren Zahl von Meerschweinchen und Kaninchen wurden auf Blutplatten ausgestrichen. Nach 20stündiger Bebrütung wurden die Platten einem Spray von Tetramethyl-p-phenylendiamin-Lösung ausgesetzt und von jeder Kultur nicht mehr als zwei oxydasepositive Kolonien verschiedener Morphologie abgeimpft. Die Reinkulturen wurden im Grampräparat geprüft, alle gramnegativen Diplokokken lyophilisiert und gesammelt. Die Eigenschaften dieser Stämme wurden in folgender Weise untersucht.

Morphologie, Lagerung und *Größe* im Grampräparat; Nachweis von *Kapseln* mit der Färbung nach Möller (1951); *Wachstumstyp* auf Blutplatten und in Bouillon; *Wachstumsansprüche* auf Blut- und Nähragarplatten bei 37° C und 22° C. *Pigmentbildung* im Methanolextrakt (Ellinghausen u. Pelczar 1955). *Hämolyse* auf 7,5%-igen Blutagarplatten und in 2%iger Blutbouillon (Schafblut).

Cytochromoxydase mit 1%iger Lösung von Tetramethyl-p-phenylendiamindihydrochlorid; *Katalase* mit 1% Wasserstoffperoxyd.

Säurebildung aus folgenden *Kohlenhydraten, Alkoholen* usw. auf Lingelsheimplatten: Glucose, Maltose, Fructose, Saccharose, Galaktose, Lactose, Mannit, Dulcit, Sorbit, Inosit, Adonit, Erythrit, Raffinose, Arabinose, Trehalose, Rhamnose, Xylose, Dextrin, Stärke, Glykogen, Inulin, Salicin. — Stämme, die auf der Lingelsheimplatte zweifelhafte oder unwahrscheinliche Reaktionen gaben, wurden mit zwei weiteren Nährböden, die 10%ige sterilfiltrierte Zuckerlösung im Verhältnis 1:10 enthielten, nachuntersucht: 1. Cystin-Trypticase-Agar (BBL) in Röhrchen; Ablesung: Umschlag des Phenolrotindicators. 2. Zuckerbouillon (Heart Infusion Broth, Difco); Ablesung: tägliche p_H-Messung mit der Glaselektrode für 7 Tage.

Bildung von *Acetylmethylcarbinol* in 1%iger Glucosepeptonlösung und 1%iger Pyruvatpeptonlösung; nach 5tägiger Bebrütung Reaktion nach Barritt. — *Polysaccharidbildung* aus Saccharose auf 5%igem Saccharoseagar (Jodreaktion).

Milchgerinnung, Harnstoff- und *Asculinspaltung* in üblicher Weise. *Indol-* und *Schwefelwasserstoffbildung* (Bleiacetatpapier) in Pankreatinbouillon (5 Tage). *Ammoniakbildung* in Nährbouillon (Heart Infusion Broth, Difco); nach fünftägiger Bebrütung Reaktion nach Hansen (1930). *Gelatineverflüssigung* in 5%iger Nährgelatine; nach siebentägiger Bebrütung bei 37° C Einbringen der Röhrchen in Eiswasser.

Reduktion von Nitrat und Nitrit in Gärröhrchen nach Einhorn und in Reagensgläsern; nach fünftägiger Bebrütung Prüfung auf Gasbildung und Nitritreaktion nach Griess-Ilosvay; bei negativem Ausfall in Nitratbouillon Versuch des indirekten Nitratnachweises durch Reduktion mit Zinkpulver (Zobell 1932). Stämme, die in 0,1%iger Nitritbouillon nicht wuchsen, wurden bei einer Konzentration von 0,01 % $NaNO_2$ nachuntersucht.

Serologie. — Neue Antisera wurden mit den Stämmen M1, M2, M39, K19 und H14 hergestellt. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte mit formalinisierten Suspensionen in zwei Injektionsserien. Entblutung am 5. Tage nach der letzten Impfung. Tyndallisierung der Antisera und Konservierung mit Merthiolat 1:10000. — Autoklavierte Extrakte wurden im Präzipitationsversuch getestet, Stämme, die nicht serum- oder kochsalzagglutinabel waren, außerdem auf dem Objektträger und im Röhrchentest agglutiniert. — Zu den serologischen Untersuchungen wurden auch vorhandene Antisera gegen *N. caviae*, *N. animalis* (NA10, NA12), *N. sicca* und *N. perflava* herangezogen.

[1] Einzelheiten der Methodik finden sich bei Zierleyn (1962).

Ergebnisse

Die beschriebenen Züchtungsversuche führten zur Isolierung von 25 Stämmen, davon 13 von Meerschweinchen, 7 von Kaninchen und 5 von Hunden.

Morphologie. Alle Stämme bestanden aus gramnegativen Diplokokken „normaler" Größe (0,5—0,7 μ), wobei die größeren Individuen den Gramfarbstoff etwas länger festhielten als die kleineren. Während einige Stämme (M2, M11, M13, M39, K15, K16, H12) ein sehr gleichmäßiges Korn zeigten, ließen andere (M37, M43, H14) ziemlich beträchtliche Größenunterschiede erkennen. Nur ein Stamm (H9) wich in seinen Dimensionen erheblich von allen übrigen ab: die Kokken besaßen hier einen Durchmesser von 1,0—1,3 μ. — *Kapseln* ließen nur fünf Stämme (M3, M36, M37, H9, H14) vermissen; besonders klar zu erkennen waren sie bei elf Stämmen (M11, M15, M39, K15, K16, K18, K29, H6, H12, H18).

Die *Kolonien* der einzelnen Stämme auf Blutagar sollen hier nicht beschrieben werden; Angaben darüber finden sich weiter unten. — In *Bouillon* proliferierten die meisten Stämme an der Oberfläche (Häutchen, Rand) und als Bodensatz, teils mit, teils ohne Trübung des Nährbodens. — Alle Stämme wuchsen *bei 37° C* auf Blut- wie auf Nähragar, während *bei 22° C* eine Reihe von Stämmen (M11, M16, M21, M36, M43, K8, K15, K29) auf keinem der beiden Nährböden Wachstum erkennen ließ.

Plattenhämolyse zeigte bei der Isolierung kein einziger Stamm; nach einigen Wochen begann jedoch M43 zu hämolysieren. In *Blutbouillon* dagegen besaßen alle Stämme die Fähigkeit, innerhalb von 3 –8 Tagen Schaferythrocyten aufzulösen. Nachdem Stamm M43 die Fähigkeit zur Plattenhämolyse erworben hatte, hämolysierte er auch in Bouillon schon nach eintägiger Bebrütung.

Ein deutlich *gelbes Pigment* der gleichen Tönung wie bei allen übrigen pigmentbildenden Neisserien besaßen nur die Stämme M3, M36 und K18, besonders kräftig ausgeprägt die Hundestämme H6, H12 und H18. — *Cytochromoxydase* und *Katalase* wurde bei allen Stämmen nachgewiesen.

An *biochemischen Eigenschaften* ließen alle Stämme die Fähigkeit, Äsculin, Salicin und Harnstoff zu spalten, Indol zu bilden und Milch zur Gerinnung zu bringen, vermissen. 17 der 25 Stämme griffen keinen der geprüften *Zucker* an.

Die Vergärungsschemata der acht Saccharolyten sind aus der Tabelle abzulesen. *Polysaccharid* wurde von allen Stämmen aufgebaut, die Saccharose auch unter Säurebildung zerlegten. *Acetylmethylcarbinol* bildeten aus Pyruvat alle Stämme, aus Glucose jedoch nur wenige (M3, M36, M37, K16, K18) in eben nachweisbarer Menge.

Ammoniak ließ sich bei fast allen Stämmen, mit nur vier Ausnahmen (M2, M13, M16, M21), in wechselnder Konzentration nachweisen. *Schwefelwasserstoff* bildete etwa die Hälfte der Stämme. *Gelatine* wurde nur von drei Hundestämmen verflüssigt (H6, H12, H18).

Gegenüber *Nitrat* und *Nitrit* verhielten sich unsere Stämme wie folgt: indifferent gegen beide Verbindungen (M1, M15, K19, K29, K30, H9); Nitrit aus Nitrat (H6, H12, H14, H18); Gas aus Nitrat und Nitrit (M2, M39, K16, K18); Gas aus Nitrit, nicht aber aus Nitrat (M3, M13, M36, M37); Nitratreduktion (ohne Gas) über Nitrit hinaus (M11, M16, M21, M31, M43, K8, K15).

In *Kochsalzlösung* und *Normalserum* ließ sich die Mehrzahl der Stämme zwar verreiben, agglutinierte aber spontan; einige bildeten auch so zähe Kolonien, daß damit eine homogene Suspension nicht herzustellen war (Tabelle), zeigten jedoch zum Teil nach einer Anzahl von Nährbodenpassagen „glatteres" Wachstum und ließen sich dann leichter homogenisieren.

Bei der *serologischen Untersuchung* erwiesen sich sechs Stämme als *N. caviae* (M11, M16, M21, M31, M43, K8), ein Stamm als *N. animalis* (M13); zwei Stämme (M36, M37) präzipitierten und agglutinierten in einem Antiserum gegen unseren Stamm NA12, der provisorisch zu *N. animalis* gestellt worden war (Berger 1960), nach unseren heutigen Erfahrungen aber eine eigene Art repräsentiert (siehe Diskussion). Mit dem Antiserum gegen K19 präzipitierten die Stämme K19, K29 und K30 kräftig, Stamm H9 schwächer, aber deutlich. Im Antiserum gegen M1 präzipitierte allein der homologe Stamm kräftig; Stamm H9 reagierte schwach, die Stämme K29 und K30 nur andeutungsweise. Von beiden Antisera wurde zudem Stamm M15 agglutiniert. Die Stämme M39 und K16 zeigten in Agglutination und Präcipitation eine gewisse Verwandtschaft mit *N. sicca* bzw. *N. mucosa*, Stamm M3 nur mit *N. sicca*.

Diskussion

Die Neisserien werden heute als obligate Schleimhautparasiten der Warmblüter angesehen. Der Warmblüter aber, der unser größtes Interesse beansprucht, ist ohne Zweifel der Mensch, und so ist es verständlich, daß die im Menschen vegetierenden Neisserien am eingehendsten untersucht und am besten bekannt sind. Bei Tieren wurden diese Keime bisher nur selten gesucht, und noch seltener wurden hier genau definierte Arten beschrieben. Katze, Hund, Affe, Meerschweinchen, Schaf und Pferd hat man als Wirte ermittelt, aber nur vier Arten aufgestellt und benannt: *N. gibbonsi* als Eitererreger bei Meerschweinchen, *N. ovis* als Erreger einer Keratoconjunctivitis beim Schaf, *N. caviae* und *N. animalis* als Saprophyten wiederum des Meerschweinchens.

Die Zuordnung von *N. gibbonsi* zur Gattung *Neisseria* erscheint uns allerdings, wenigstens nach heutigen Maßstäben, problematisch. Die hämolysierenden, streptokokkenartig feinen Kolonien auf Blutagar, die obligate Serophilie, die Befähigung zu anaerobem Wachstum und die ausgeprägte saccharolytische Aktivität lassen viel eher an eine Zugehörigkeit zu der neuen Gattung *Gemella* (Berger 1961) denken. Eine Entscheidung dieser Frage ist heute jedoch nicht mehr möglich, da der Nachweis von Oxydase und Katalase, der beiden kritischen Fermente, von Gibbons offenbar nicht versucht wurde, und da auch kein Stamm dieser Art mehr erhalten ist.

Nach unseren Erfahrungen trifft man Neisserien in der Mundhöhle von Tieren allerdings viel seltener und in geringerer Zahl als beim Menschen; während sie bei Meerschweinchen noch fast regelmäßig nachzuweisen sind, fanden wir sie nur bei 5 von 20 Hunden, noch seltener bei Kaninchen und, abweichend von Flexner (1907), gar nicht bei Katzen.

Oxydasepositive Kolonien enthielten zwar die Kulturen aller untersuchten Tiere, doch ergab die mikroskopische Kontrolle dann in den meisten Fällen Moraxellen, andere gramnegative Stäbchen oder oscillarienähnliche Mikroorganismen.

Der erste Blick auf unsere Ergebnisse offenbart eine verwirrende Vielzahl biochemischer Typen, doch ließen sich die meisten schließlich, vorwiegend auf dem Boden von Zuckervergärungen, Gelatineverflüssigung und Nitrat- bzw. Nitritreduktion, zu einer übersehbaren Zahl homogener Gruppen zusammenfassen, die zum Teil schon bekannten Arten zugeordnet werden konnten. Diese Gruppierung wurde bei der Aufstellung der Tabelle bereits berücksichtigt.

Die ersten sechs Stämme (Tabelle), sämtlich vom *Meerschweinchen*, sind pigmentlose Asaccharolyten, bilden meist Ammoniak und manchmal Schwefelwasserstoff; sie wachsen bei 22° C im allgemeinen nicht, sind nicht kochsalz- und nur ausnahmsweise serumagglutinabel. Sie reduzieren Nitrat über Nitrit hinaus, ohne jedoch Gas zu bilden. Diese Stämme verhalten sich also wie *Neisseria caviae* und reagierten auch mit homologen Antisera. — Wegen seiner biochemischen Eigenschaften wurde der Stamm K 15 zur gleichen Gruppe gestellt, obwohl seine Kolonien eine abweichende Konsistenz aufwiesen und sein Extrakt mit den *N. caviae*-Antisera nicht präzipitierte.

Einige dieser Stämme (M 11, M 31, K 8, K 15) reduzierten Nitrat so schwach, daß der Ausfall der Reaktion nach Zobell in 0,1%iger Nitratbouillon keinen Nitratschwund erkennen ließ. Sie verhielten sich also scheinbar indifferent gegen Nitrat und reduzierten nur Nitrit. Die Wiederholung der Reaktion in Kulturen mit geringerem Nitratgehalt (0,03%) „entlarvte" dann jedoch diese schwachen Nitratreduzierer.

Auf Grund dieser Erfahrung müssen auch die Angaben, die wir in einer früheren Mitteilung (1961) zur Nitratreduktion von *N. caviae* gemacht haben, ergänzt werden: *alle* Stämme dieser Art reduzieren Nitrat über Nitrit hinaus, die nitratnegativen Stämme waren tatsächlich nur nitratschwach. Den damals als *N. caviae* klassifizierten nitritbildenden Stamm R halten wir heute nicht mehr für einen Angehörigen dieser Art.

Tabelle. *Die Eigenschaften von 25 Neisseria-Stämmen tierischer Herkunft*

Stamm	Wachstum bei 22°C	Pigment	Glucose	Maltose	Fructose	Saccharose	Galaktose	Lactose	Mannit	Polysaccharid	Reduktion von		Bildung von		Gelatinase	agglutinabel in		Artdiagnose
											NO_3	NO_2	NH_3	H_2S		NaCl	Serum	
M 11	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	$-NO_2\rightarrow$	+	+	−	−	−	−	N. caviae
M 16	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	$-NO_2\rightarrow$	+	−	−	−	−	−	N. caviae
M 21	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	$-NO_2\rightarrow$	+	−	sp	−	−	−	N. caviae
M 31	(+)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	$-NO_2\rightarrow$	+	+	−	−	−	+	N. caviae
M 43	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	$-NO_2\rightarrow$	+	+	+	−	−	+	N. caviae
K 8	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	$-NO_2\rightarrow$	+	+	−	−	−	−	N. caviae
K 15	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	NO_2	+	+	+	−	bröcklig		~ N. caviae
M 13	(+)	−	−	−	−	(+)	−	−	−	+	−	N_2	−	+	−	+	+	N. animalis
M 36	−	−	+	−	+	+	−	−	(+)	+	−	N_2	+	(+)	−	−	+	N. denitrificans
M 37	+	−	+	−	+	+	−	−	(+)	+	−	N_2	+	(+)	−	−	+	N. denitrificans
H 6	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	NO_2	−	(+)	+	+	bröcklig		N. canis
H 12	+	++	−	−	−	−	−	−	−	−	NO_2	−	+	+	+	+	+	N. canis
H 18	+	++	−	−	−	−	−	−	−	−	NO_2	−	(+)	+	+	bröcklig		N. canis
K 19	(+)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	(+)	−	−	bröcklig		N. cuniculi
K 29	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	(+)	−	−	bröcklig		N. cuniculi
K 30	(+)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	(+)	−	−	bröcklig		N. cuniculi
M 1	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	sp	−	+	+	~N. cuniculi
M 15	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	sp	−	(+)	(+)	~N. cuniculi
H 9	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+	+	N. cuniculi var. gigantea
M 39	+	(+)	−	+	(+)	+	−	−	−	+	N_2	N_2	(+)	+	−	+	+	~N. mucosa
K 16	(+)	−	+	+	(+)	+	−	−	(+)	+	N_2	N_2	+	+	−	+	+	~N. mucosa
M 3	(+)	+	+	+	(+)	+	−	−	(+)	+	−	N_2	+	+	−	bröcklig		~N. sicca
M 2	(+)	−	(+)	+	+	+	+	+	−	+	N_2	N_2	−	(+)	−	−	−	~N. crassa
K 18	+	+	+	−	(+)	+	−	−	(+)	+	N_2	N_2	+	(+)	−	+	+	unbestimmbar
H 14	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	NO_2	−	+	sp	−	(+)	(+)	unbestimmbar

Anmerkung. Der Buchstabe in der Stammbezeichnung bedeutet die Quelle (M = Meerschweinchen, K = Kaninchen, H = Hund). — Die Zeichen in den Spalten Nitrat- und Nitritreduktion bedeuten die Endprodukte: NO_2 = Nitritbildung; $-NO_2\rightarrow$ = Nitratreduktion über Nitrit hinaus (ohne Gas); N_2 = Gasbildung; + = Nitritreduktion ohne Gasbildung. — sp = Spur.

Der achte Stamm (M13) gehört zu *Neisseria animalis* (Abb. 1). Er ist pigmentfrei, vergärt nur Saccharose, bildet aus diesem Zucker auch Polysaccharid, denitrifiziert Nitrit und präzipitierte in einem spezifischen Antiserum. Wir verfügen nunmehr über vier Stämme dieser neuen Art.

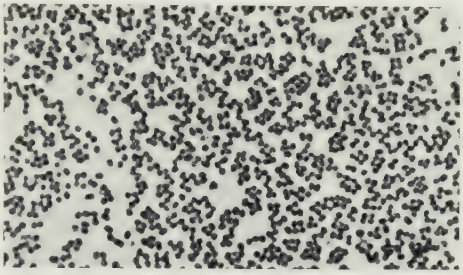


Abb. 1. Neisseria animalis (1200×)

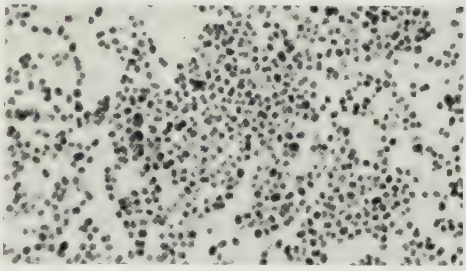


Abb. 2. Neisseria denitrificans (1200×)

Die beiden folgenden Stämme (M36, M37), wiederum vom *Meerschweinchen*, sind aktivere Saccharolyten als *N. animalis*: außer Saccharose werden von ihnen noch Glucose, Fructose und Mannit verwertet. Wie diese denitrifizieren sie Nitrit und synthetisieren Polysaccharid aus Saccharose. Einer der beiden Stämme (M36) war zur Bildung von Pigment befähigt. In Kochsalzlösung ließen sich stabile Suspensionen herstellen, während die Kokken in Serum spontan agglutinierten. Dieses Verhalten entspricht in allen Punkten dem unseres früher beschriebenen Stammes NA12 (Berger 1960), den wir damals, da wir nur über einen einzigen Stamm verfügten, trotz seiner biochemischen und serologischen Abweichungen provisorisch zu *N. animalis* gestellt hatten. Die Erfahrung, daß dieser Stamm nicht nur durch sein Vergärungsschema, sondern auch durch das Ausmaß seiner Säurebildung von *N. animalis* beträchtlich abweicht, bestärkte unsere Zweifel an der Gültigkeit dieser Klassifizierung (Berger 1962). Nachdem wir nun zwei weitere, mit NA12 biochemisch und serologisch identische Stämme besitzen, sind wir der Überzeugung, daß es sich um Vertreter einer eigenen Art handelt, die wir wegen ihrer Fähigkeit, zu denitrifizieren, als *Neisseria denitrificans* bezeichnen wollen. Die Stämme dieser Art zeigen keine Kreuzreaktionen in *N. animalis*-Antisera.

Da die Fähigkeit, zu denitrifizieren, innerhalb der Gattung *Neisseria* keineswegs nur bei *N. denitrificans* beobachtet wird, könnte diese Benennung wenig treffend erscheinen. Es sei jedoch in diesem Zusammenhang an zwei Präzedenzfälle erinnert: weder *Pseudomonas denitrificans* noch *Micrococcus denitrificans* sind bekanntlich die einzigen Denitrifikanten ihrer Gattungen.

Die nächste Gruppe der Tabelle umfaßt drei von *Hunden* gezüchtete Stämme (H6, H12, H18). Es sind kräftige Pigmentbildner, die auch bei 22°C gut wachsen; sie greifen zwar keine Zucker an, sind aber die einzigen bisher bekannten Neisserien, die Gelatine verflüssigen. Ammoniak und Schwefelwasserstoff werden ebenfalls gebildet, Nitrat wird zu Nitrit reduziert. Die Kolonien besitzen eine zähe Konsistenz und lassen sich deshalb meist nur bröcklig zerteilen. Hier handelt es sich zweifellos um eine neue Art, die durch Pigmentbildung, Indifferenz gegen Kohlenhydrate, Gelatineverflüssigung und Nitritbildung charakterisiert und damit gegen alle bekannten Arten leicht abzugrenzen ist. Wir schlagen vor, sie wegen ihrer Herkunft *Neisseria canis* zu nennen.

Die drei folgenden Stämme (K19, K29, K30) waren von *Kaninchen* isoliert und erwiesen sich als besonders indifferent: außer der Fähigkeit, in Peptonbouillon Spuren von Ammoniak zu bilden, war ihnen im Rahmen der geprüften Merkmale überhaupt nichts nachzuweisen. Die Kolonien waren weißlich, erhaben und meist runzlig mit der Tendenz, in die S-Form umzuschlagen, und gleichen damit weitgehend denen von *N. sicca*. Neisserien dieses Verhaltens waren ebenfalls bisher unbekannt und müssen deshalb als Angehörige einer neuen Art angesehen werden. Alle drei Stämme präzipitierten kräftig in einem mit dem Stamm K19 hergestellten Antiserum, so daß auch an ihrer Gleichartigkeit kein Zweifel besteht. Als Artname wurde *Neisseria cuniculi* gewählt.

In die gleiche Gruppe wurden zwei Stämme von *Meerschweinchen* aufgenommen (M1, M15), da sie sich biochemisch sehr ähnlich verhielten: sie zeigten sich zwar etwas robuster gegen niedrige Temperaturen, etwas aktiver bei der Ammoniak- und Schwefelwasserstoffbildung, und auch ihre Kolonien waren flacher, größer und weniger kohärent als bei *N. cuniculi*; wie diese aber waren sie völlig indifferent gegen Kohlenhydrate sowie gegen Nitrat und Nitrit. Auch agglutinatorisch ergaben sich Beziehungen: Stamm M15 wurde sowohl im M1- wie im K19-Antiserum agglutiniert; mit den anderen Stämmen dieser Gruppe ließen sich keine für die Agglutination brauchbaren Suspensionen herstellen. In der Präcipitation zeigte sich diese Verwandtschaft nicht.

Auch der folgende Stamm (H9), aus dem Rachen eines *Hundes*, wurde der *N. cuniculi*-Gruppe zugeordnet, da er mit biochemischen Methoden von den eben beschriebenen Stämmen nicht abzutrennen war und im K19-Antiserum deutlich, im M1-Antiserum schwach präzipitierte. Er unterscheidet sich von *N. cuniculi* lediglich im Aussehen der Kolonien und in seiner Morphologie. Die Kolonien sind flacher, glatt und transparent, ähnlich denen der Gonokokken, und verfärben den Blutagar etwas grünlich. Die Keime selbst aber besitzen einen Durchmesser von 1,0—1,3 μ und sind damit an Volumen etwa fünfmal größer als die Kokken aller übrigen Arten ihrer Gattung (Abb. 3). Einen Stamm gramnegativer, oxydasepositiver Diplokokken von diesen Dimensionen hatte bereits Debord (1939) aus einer normalen Vagina isoliert und im Jahre

1942 unter dem Namen *N. gigantea* als neue Art beschrieben. Bedauerlicherweise existiert dieser Stamm nicht mehr. Bei der Übereinstimmung im Aussehen der Kolonien, in der Größe der Individuen und ihrer biochemischen Inaktivität (Debord 1942) besteht aber wohl trotz der verschiedenen Fundorte kein Grund, unseren Stamm H9 nicht mit *N. gigantea* zu identifizieren. Fraglich erscheint nur, ob dieser Typ zur Zeit als eigene Art anerkannt werden kann. Die Übereinstimmung des Stammes H9 mit *N. cuniculi* ist biochemisch fast vollständig, serologisch geht sie ebenfalls recht weit. Da die einzigen bis heute bekannten Unterschiede im Aussehen der Kolonien und in der Größe der Kokken bestehen, halten wir es für vernünftiger, *N. gigantea* vorläufig nur den Rang einer Varietät, als *N. cuniculi* var. *gigantea*, einzuräumen.

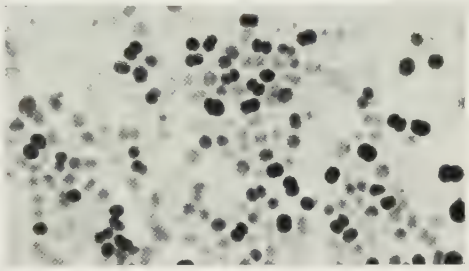


Abb. 3. Neisseria cuniculi var. gigantea (1200×)

Die nächsten vier Stämme wiesen mehr oder weniger enge Beziehungen zu menschlichen Neisserien auf: zu *N. mucosa* (M 39, K 16), *N. sicca* (M 3) und *N. crassa* (M 2).

Neisseria mucosa wurde von Véron, Thibault u. Second (1959, 1961) in Anlehnung an v. Lingelsheim (1906) neu beschrieben und ist nicht identisch mit dem pleomorphen, im System schwer einzuordnenden „Diplococcus mucosus" der neueren Autoren. Nach Véron u. Mitarb. (1959) besitzt *N. mucosa* zwar regelmäßig Kapseln, bildet aber nicht immer Schleim und denitrifiziert Nitrat; im übrigen ist sie von *N. sicca* nicht zu unterscheiden und hat mit dieser Art auch ein O-Antigen gemeinsam (Véron u. Mitarb. 1961). Unser Stamm M 39 entspricht dieser Beschreibung, bis auf die irrelevante Indifferenz gegen Glucose, völlig und präzipitierte auch mit drei von vier *N. sicca*-Antisera. Umgekehrt wurde ein Stamm von *N. mucosa* (5950), den wir der Freundlichkeit von Dr. M. Véron, Paris, verdanken, im M 39-Antiserum agglutiniert. Der zweite Stamm, K 16, unterschied sich von M 39 und *N. mucosa* lediglich durch seine Fähigkeit, Mannit anzugreifen. Auf dem Objektträger agglutinierte er kräftig im M 39-Antiserum. So wird man die Stämme M 39 und K 16 als enge Verwandte von *N. mucosa* (Véron u. Mitarb.) ansehen dürfen.

Stamm M 3, ein Saccharolyt vom *Meerschweinchen*, ist, wie die Tabelle zeigt, ebenfalls in der Lage, Mannit anzugreifen; in allen übrigen biochemischen Merkmalen aber verhält er sich wie eine pigmentbildende *N. sicca*, bildet die gleichen runzligen, zähen Kolonien und präzipitierte auch in drei von vier *N. sicca*-Antisera.

Der nächste Stamm (M 2) fiel durch seine Fähigkeit, außer den üblichen vier Zuckern auch Galaktose und Lactose anzugreifen, auf. Dieses Vergärungsschema wird bekanntlich dem *Diplococcus crassus* zugeschrieben. Da auch hier kein Vergleichsstamm beschafft werden konnte[1], mußte die Diagnose nach den vorliegenden Beschreibungen (v. Lingelsheim 1906; Ficker 1909; Elser u. Huntoon 1909) gestellt werden.

Danach ist *D. crassus* größer als der Meningococcus und gramlabil; seine Kolonien sind klein (1—1,5 mm ⌀), weißgrau, rund und glattrandig und geben eine positive Oxydasereaktion. Wachstum erfolgt auch bei Raumtemperatur. Er vergärt Glucose, Maltose, Fructose, Saccharose, Galaktose und Lactose, nicht aber Mannit, Dulcit, Dextrin und Inulin. Lackmusmilch wird gesäuert. Er ist nicht gallelöslich und wird durch Meningokokken-Antiserum häufig agglutiniert.

Unser Stamm M 2 stimmte in allen kulturellen und biochemischen Eigenschaften mit dieser Beschreibung überein und wurde auch von einem käuflichen Anti-Meningokokken-Mischserum agglutiniert. Nur in zwei Punkten verhielt er sich abweichend: die Kokken waren eher klein und eindeutig gramnegativ, und der Stamm war gallelöslich. Bei der fast vollständigen Übereinstimmung in den aus der Literatur bekannten mit den von uns ermittelten Merkmalen erscheint es wohl zulässig, unseren Stamm M 2 als identisch oder zumindest sehr nahe verwandt mit *Neisseria crassa* anzusehen, denn es besteht kein Grund, gramnegative (oder gramlabile) oxydasepositive Diplokokken nicht der Gattung *Neisseria* zuzurechnen.

Die beiden letzten Stämme schließlich ließen sich keiner bekannten Art zuordnen. *Stamm K 18* war ein Saccharolyt, der auch Mannit verwertete und Nitrat denitrifizierte; von *N. mucosa* wich er durch sein Unvermögen, Maltose zu vergären, ab. — *Stamm H 14* dagegen bildete Nitrit aus Nitrat und griff keine Kohlenhydrate an. Biochemisch besteht somit eine weitgehende Übereinstimmung mit *N. ovis*, die aber serologisch nicht bestätigt werden konnte.

Abschließend läßt sich aus den beschriebenen Untersuchungen also folgern: Neisserien finden sich bei Tieren ebenso wie beim Menschen, wohl immer aber in geringerer Zahl. Beim Meerschweinchen sind sie verhältnismäßig häufig, bei Hunden und Kaninchen seltener; bei einer kleinen Zahl von Katzen konnten wir sie gar nicht nachweisen, obwohl Flexner (1907) von diesen Tieren gramnegative Diplokokken isoliert hatte. Auffällig ist jedoch, daß die bei Tieren gefundenen Arten weitgehend wirtsspezifisch sind *(N. caviae, N. canis, N. cuniculi, N. ovis)* und auch mit den humanen Neisserien nicht übereinstimmen. Nur ausnahmsweise trifft man bei Tieren Stämme, die mit *N. mucosa*, *N. sicca* und *N. crassa* des Menschen eng verwandt sind; das gleiche gilt beispielsweise für das Vor-

[1] Wir hatten deswegen bei fünf deutschen und vier internationalen Sammlungen angefragt.

kommen von *N. caviae* beim Kaninchen. Während beim Menschen die saccharolytischen Arten vorherrschen, überwiegen bei den von uns untersuchten Tieren die Asaccharolyten.

Artbeschreibungen[1]

1. Neisseria denitrificans n. sp.

Gramnegative, ziemlich ungleichmäßige Diplokokken, meist mit mehr oder weniger gut ausgebildeten Kapseln.

Kolonien auf Blutagar grau, flach, glatt, konfluierend, von 1—1,5 mm ⌀; keine Hämolyse; manchmal gelbes Pigment.

Auf Nähragar bei 22° C kein regelmäßiges Wachstum.

In Bouillon Rand, diffuse Trübung.

Oxydase und Katalase positiv.

Säure aus Glucose, Fructose, Saccharose und Mannit, nicht aus Maltose; Polysaccharid aus Saccharose.

Ammoniak aus Peptonbouillon, wenig Schwefelwasserstoff aus Pankreatinbouillon.

Gelatine nicht verflüssigt.

Nitrat nicht angegriffen, Nitrit zu Stickstoff reduziert.

In NaCl stabile Suspensionen, in Serum Spontanagglutination.

Serologisch einheitliche Gruppe.

Quelle: Mundschleimhaut von Meerschweinchen.

2. Neisseria canis n. sp.

Gramnegative, etwas ungleichmäßige Diplokokken mit Kapseln; gelegentlich Tetraden.

Kolonien auf Blutagar anfangs ziemlich klein (etwa 1 mm ⌀), erhaben, glatt, konfluierend, gelblich; später zentraler Knopf und Randsaum; keine Hämolyse; kräftig gelbes Pigment.

Wachstum auf Nähragar bei 22° C.

In Bouillon Rand, kräftiges Oberflächenhäutchen, geringe Trübung, flockiger Bodensatz.

Oxydase positiv, Katalase stark positiv.

Kohlenhydrate nicht vergoren, kein Polysaccharid aus Saccharose.

Ammoniak aus Peptonbouillon, Schwefelwasserstoff aus Pankreatinbouillon.

Gelatine verflüssigt.

Nitrat zu Nitrit reduziert.

In NaCl und Serum nur bröcklig zu zerteilen oder agglutinabel.

Quelle: Mundschleimhaut von Hunden.

3. Neisseria cuniculi n. sp.

Gramnegative, ziemlich ungleichmäßige Diplokokken und Tetraden mit Kapseln.

Kolonien auf Blutagar weißlich, erhaben, zäh, nicht zu homogenisieren, oft runzlig mit Tendenz zum Umschlagen in die S-Form. Keine Hämolyse; kein Pigment.

---

[1] *Anmerkung.* Typstämme dieser Arten wurden der American Type Culture Collection, Washington, übergeben und dort wie folgt registriert: *N. denitrificans* M37 als ATCC 14686; *N. canis* H6 als ATCC 14687; *N. cuniculi* K19 als ATCC 14688; *N. cuniculi* var. *gigantea* H9 als ATCC 14689. — Sie stehen auch beim Centre international de distribution de souches et d'information sur les types microbiens, Lausanne, zur Verfügung.

Wachstum auf Nähragar bei 22° C gering oder fehlend.
In Bouillon diffuse Trübung, etwas flockiger oder membranöser Bodensatz.
Oxydase und Katalase positiv.
Keine Kohlenhydrate vergoren, keine Bildung von Polysaccharid.
Wenig Ammoniak aus Peptonbouillon; keine Schwefelwasserstoffbildung. Gelatine nicht verflüssigt.
Weder Nitrat noch Nitrit reduziert.
Serologisch einheitliche Gruppe.
Quelle: Mundschleimhaut von Kaninchen.

3a. Neisseria cuniculi var. *gigantea* (*N. gigantea* Debord 1942) verhält sich biochemisch wie *N. cuniculi* und ist mit dieser auch serologisch eng verwandt.
Sie unterscheidet sich von ihr durch den Aspekt der Kolonien (größer, flach, glatt, transparent, später unregelmäßiger Randsaum) und die ungewöhnliche Größe der Individuen (1,0—1,3 μ ⌀).
Quellen: menschliche Vagina (Debord 1939); Mundschleimhaut eines Hundes.

Zusammenfassung

Von Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden wurden 25 Stämme von *Neisseria* gezüchtet und vorwiegend auf dem Boden von Zuckerverwertung, Nitrat- bzw. Nitritreduktion und Gelatineverflüssigung klassifiziert. Sechs dieser Stämme gehörten zu *N. caviae*, einer zu *N. animalis*. Drei neue Arten wurden aufgestellt: *N. denitrificans*, *N. canis* und *N. cuniculi*. *N. gigantea* Debord wurde wiedergefunden und als Varietät von *N. cuniculi* klassifiziert. Einige der tierischen Stämme waren den beim Menschen vorkommenden Species *N. mucosa*, *N. sicca* und *N. crassa* offenbar sehr eng verwandt. Im übrigen verhalten sich die Arten weitgehend wirtsspezifisch.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

Barritt, M.: The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α-naphthol. J. Path. Bact. **42**, 441 (1936).
Berger, U.: Neisseria animalis nov. spec. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 158 (1960).
Berger, U.: A proposed new genus of Gram negative cocci: Gemella. Int. Bull. bact. Nomencl. **11**, 17 (1961).
Berger, U.: Reduktion von Nitrat und Nitrit durch Neisseria. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 45 (1961).
Berger, U.: Untersuchungen über die Säurebildung durch saccharolytische anspruchslose Neisserien. Arch. Hyg. (Berl.) **146**, 55 (1962).
Bitter, L., u. M. Gundel: Über die Mundflora von Pflanzenfressern und Omnivoren. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **96**, 243 (1925).
Debord, G. G.: Organisms invalidating the diagnosis of gonorrhea by the smear method. J. Bact. **38**, 119 (1939).
Debord, G. G.: Descriptions of Mimeae trib. nov. with three genera and three species and two new species of Neisseria from conjunctivitis and vaginitis. Iowa St. J. Sci. **16**, 471 (1942).
Ellinghausen, H. C., and M. J. Pelczar: Spectrophotometric characterization of Neisseria pigments. J. Bact. **70**, 448 (1955).

Flexner, S.: Contributions to the biology of Diplococcus intracellularis. J. exp. Med. **9**, 105 (1907).

Gibbons, N. E.: Hemophilus sp. and Neisseria sp. in skin abscesses in rabbits and guinea pigs. J. infect. Dis. **45**, 288 (1929).

Hansen, P. A.: Ein neues Ammoniakreagens und seine Anwendung in der Bakteriologie. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **115**, 388 (1930).

Hauduroy, P., G. Ehringer, A. Urbain, G. Guillot et J. Magrou: Dictionnaire des bactéries pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes. Paris: Masson & Cie. 1937.

Lindquist, K.: A Neisseria species associated with infectious keratoconjunctivitis of sheep — Neisseria ovis nov. spec. J. infect. Dis. **106**, 162 (1960a).

Lindquist, K.: Persönliche Mitteilung (1960b).

Lingelsheim, W. v.: Die bakteriologischen Arbeiten der Kgl. Hygienischen Station zu Beuthen O.-Schl. während der Genickstarreepidemie in Oberschlesien im Winter 1904/05. Klin. Jb. **15**, 373 (1906).

Möller, O.: A new method for staining bacterial capsules. Acta path. microbiol. scand. **28**, 127 (1951).

Pelczar, M. J.: Neisseria caviae nov. spec. J. Bact. **65**, 744 (1953).

Pelczar, M. J., J. P. Hajek and J. E. Faber: Characterization of Neisseria isolated from the pharyngeal region of guinea pigs. J. infect. Dis. **85**, 239 (1949).

Véron, M., P. Thibault et L. Second: Neisseria mucosa (Diplococcus mucosus Lingelsheim). I. Description bactériologique et étude du pouvoir pathogène. Ann. Inst. Pasteur **97**, 497 (1959).

Véron, M., P. Thibault et L. Second: Neisseria mucosa (Diplococcus mucosus Lingelsheim). II. Étude antigénique et classification. Ann. Inst. Pasteur **100**, 166 (1961).

Zierleyn, I.: Einige Untersuchungen über saprophytische Neisserien bei Tieren. Diss. (med. dent.) Hamburg 1962.

Zobell, C. E.: Factors influencing the reduction of nitrates and nitrites by bacteria in semisolid media. J. Bact. **24**, 273 (1932).

Priv.-Doz. Dr. U. Berger,
Bakteriologisches Labor der Universitäts-Zahnklinik,
2 Hamburg 20, Martinistraße 52

Zeitschrift f. Hygiene 148, 458—465 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität
Münster in Westfalen (Direktor: Professor Dr. med. H. Reploh)

Über den Einfluß von Cylophosphamid (Endoxan) und 2,3,5-Tris-äthylen-imino-benzochinon (Trenimon) auf die Antikörperbildung bei der Ratte

Von
Ludger Lutzmann und Hans Dieter Deppe

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 3. April 1962)

Bei der weitverbreiteten Anwendung der Cytostatica zur medikamentösen Behandlung maligner Tumoren ist, ungeachtet des oft großen therapeutischen Wertes dieser Pharmaka, die Frage nach ihren Nebenwirkungen von besonderem Interesse. Aus dem umfangreichen klinischen Schrifttum über die Chemotherapie der bösartigen Geschwülste sind zahlreiche, den Patienten subjektiv und objektiv belastende „Nebenerscheinungen" bekannt, die heute wohl allgemein als ein Teil der Wirkung dieser Substanzen angesehen werden. Als Beispiel sei hier die so charakteristische Endoxan-Alopecie genannt, deren Entstehung nach Braun-Falco[1] auf Stoffwechselstörungen an den Haarmatrixzellen beruhen dürfte, und bei welcher der Grad der Dysfermentie der mitotisch-aktiven Haarmatrix das Ausmaß der Folgen bestimmt. Bekannt sind weiterhin die tiefgreifenden Schäden im hämatopoetischen System, die, wiewohl reversibel, dennoch ein sofortiges Absetzen der Therapie erforderlich machen.

Durch Einführung des Prinzips der „Transportform-Wirkform" beim Endoxan hat nach Brock[2] dieser cyclische Phosphamidester gegenüber anderen Vergleichssubstanzen sowohl eine herabgesetzte Allgemeintoxicität wie auch eine verminderte spezielle toxische Organotropie. Durch seine bevorzugte, wohl enzymatische Aktivierung im Tumor selbst wird ihm ein besonders günstiger therapeutischer Effekt zugesprochen, der sich unter anderem in einer wesentlichen Vergrößerung des therapeutischen Index, einer verminderten toxischen Knochenmarkschädigung und einem selbst bei hohen Dosen völlig unbeeinflußten DPN-Gehalt im Knochenmark ausdrückt. Die Senkung des DPN im Tumorgewebe vermindert die Dehydrogenierung der Glycerinaldehydphosphorsäure und hemmt dadurch die Glykolyse der malignen Zelle. Zwar ist nicht sicher, ob dieses Phänomen dem entscheidenden Angriffspunkt der Cytostatica

entspricht, zumal von anderen Autoren (Busch u. Potter[4]) einer möglichen Hemmung der Acetatoxydation eine besondere Bedeutung beigemessen wird; nach Untersuchungen von Pütter[13,14] aber muß man die Hemmung der aeroben Glykolyse doch für besonders wichtig halten, „nicht zuletzt wegen der guten Übereinstimmung der cytostatisch und antiglykolytisch in vitro wirksamen Konzentrationen".

Das glykolytisch wirksamste Cytostaticum ist das Trenimon[13].

Wenn man annimmt, daß es eine Tumorspezifität der Cytostatica nicht gibt, sondern daß der cytostatische Effekt dieser Pharmaka in Geweben mit gesteigerter Stoffwechselaktivität lediglich deutlicher in Erscheinung tritt, daß die Unterschiede in der Beeinflussung des Stoffwechsels verschiedener Gewebe also mehr quantitativer als qualitativer Art sind[5], so darf man auch mit Nebenwirkungen rechnen, welche andere, außerhalb des Tumorstoffwechsels gelegene und zum Teil auch lebenswichtige Regulationen des Organismus betreffen.

Diese Überlegung hat uns veranlaßt zu prüfen, ob cytostatisch wirksame Substanzen auch auf die Bildung von Antikörpern einen Einfluß nehmen.

Als Versuchsmodell dienten uns hierbei mit Staphylokokken infizierte Ratten, deren Staphylokokken-α-Antitoxin-Titer jeweils nach Beendigung der Versuchsreihe bestimmt und zu den ermittelten Werten vergleichbarer Kontrollgruppen in Beziehung gesetzt wurden.

Als Cytostatica verwendeten wir N,N-Bis-(β-chloräthyl)-N,O-äthylen-phosphorsäureester-diamid (Endoxan)* und 2,3,5-Tris-äthylenimino-benzochinon (Trenimon)*. Eine weitere Tiergruppe wurde an Stelle eines Cytostaticums mit Prednisolon behandelt, weil den Corticosteroiden von einigen Autoren ebenfalls ein gewisser cytostatischer Effekt zugesprochen und eine Einflußnahme dieser Hormone auf die Antikörperbildung diskutiert wird.

Methodik

Als Versuchstiere dienten weibliche Sprague-Dawley-Ratten im Gewicht von etwa 130 g, die normales Mischfutter und Wasser ad libitum erhielten.

Die Sensibilisierung der Tiere durch i.v. Injektion von jeweils 0,2 ml Eiklar, die Infektion mit Bouillonkulturen des Staphylokokken-Stammes Wood 46 („Human"-Institut Budapest) sowie das Injektionsschema der verwendeten Cytostatica bzw. des Prednisolon (aus äthanolischer Stammlösung hergestellte Suspensionen in physiologischer NaCl) sind in dem nachfolgenden Zeitplan im einzelnen aufgeführt.

Die Aufteilung der Versuchstiere in die zur späteren Beurteilung erforderlichen Haupt- und Kontrollwerte ergab neun Gruppen (siehe auch Tab. 1), bei denen jeweils die folgenden Injektionen durchgeführt wurden:

* Für die freundliche Überlassung der Versuchsmengen von Endoxan und Trenimon möchten wir den ASTA-Werken bzw. den Bayer-Werken, Leverkusen, auch an dieser Stelle danken.

Die Keimzahl der für die i.v. Injektion verwendeten Bouillonkulturen wurde in einer nach Deppe* modifizierten Methode durch konduktometrische Impulszählung bestimmt. Dabei inkubierten wir jeweils eine mit dem Keim beimpfte Bouillon für 3—4 Std bei 37°C im Schüttelthermostaten, brachten den Ansatz unmittelbar nach der Inkubation in ein Eisbad und verdünnten die Stammkultur nach der Keimzahlbestimmung durch Zusatz von physiologischer NaCl in der Weise, daß 0,2 ml der verdünnten Kultur noch etwa $3 \cdot 10^6$ Keime enthielten. Im weiteren

Tabelle 1

Gruppe 1: Eiklar, 0,2 ml i.v., am 4. Tag.

Gruppe 2: Eiklar, 0,2 ml i.v., am 4. Tag; $3 \cdot 10^6$ Staphylokokken in 0,2 ml Bouillonkultur am 14. Tag.

Gruppe 3: Eiklar, 0,2 ml i.v., am 4. Tag; Endoxan, jeweils 10 mg/kg, am 1., 4., 7., 10., 17. und 20. Tag.

Gruppe 4: Eiklar, 0,2 ml i.v., am 4. Tag; Trenimon, jeweils 25 µg/kg, am 1., 4., 7., 10., 17. und 20. Tag.

Gruppe 5: Eiklar, 0,2 ml i.v., am 4. Tag; Prednisolon, jeweils 3 mg/kg, am 1., 4., 7., 10., 17. und 20. Tag.

Gruppe 6: Eiklar, 0,2 ml i. v., am 4.Tag; Endoxan, jeweils 10 mg/kg, am 1., 4., 7., 10., 17. und 20. Tag; $3 \cdot 10^6$ Staphylokokken in 0,2 ml Bouillonkultur am 14. Tag.

Gruppe 7: Eiklar, 0,2 ml i.v., am 4. Tag; Trenimon, jeweils 25 µg/kg, am 1., 4., 7., 10., 17. und 20. Tag; $3 \cdot 10^6$ Staphylokokken in 0,2 ml Bouillonkultur am 14. Tag.

Gruppe 8: Eiklar, 0,2 ml i.v., am 4. Tag; Prednisolon, jeweils 3 mg/kg, am 1., 4., 7., 10., 17. und 20. Tag; $3 \cdot 10^6$ Staphylokokken in 0,2 ml Bouillonkultur am 14. Tag.

Gruppe 9: Unbehandelt.

Versuchsverlauf wurden sodann aus der eiskalten Stammkultur in Abständen von 10—15 min jeweils neue Verdünnungen für die folgenden Injektionen hergestellt, um einem möglichen Abfall der Keimzahl vorzubeugen. Die zeitliche Abhängigkeit der Keimzahl vom Inkubationsmedium ist aus der Abb. 1 zu ersehen, wobei jedoch lediglich der bei unseren Versuchen verwendete Staphylokokkenstamm berücksichtigt wurde.

Die Bestimmung der Staphylokokken-α-Antitoxin-Titer erfolgte nach einer auf Ipsen[7] zurückgehenden und durch Kienitz[8] modifizierten Methode**, deren Fehlerbreite mit $\pm 15\%$ angegeben wird.

* Im Druck.

** Die Bestimmungen wurden durchgeführt im Bakteriologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik, wofür wir Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Kienitz auch an dieser Stelle herzlich danken möchten.

Ergebnisse und Diskussion

Um die hohe Resistenz der Ratte gegenüber Staphylokokkeninfektionen zu durchbrechen, setzten Kienitz u. Mitarb.[9,10,11,15] „vor der Infektion mit der zweimaligen Injektion von Eiklar eine in ihren Auswirkungen noch nicht zu übersehende Allgemeinschädigung des Organismus, deren sichtbares Zeichen die eingetretene Nierenschädigung darstellt".

Interessant ist nun, daß die durch die parenterale Applikation von heterologem Protein in ihrer Resistenzlage deutlich reduzierten Versuchstiere kleinere Dosen von Staphylokokkentoxin (Behringwerke) weitaus besser tolerierten als die gesunden Kontrollen[9]. Bei der Ermittlung der LD_{50} für Endoxan und Trenimon machten wir bei gleicher Versuchsanordnung gegensätzliche Erfahrungen: die mit Eiklar sensibilisierten Tiere waren spätestens am 3. Tag nach Injektion des Cytostaticum verendet, während die eiweißfreien Kontrollen bei Dosen, die der LD_{50} entsprachen, während einer Beobachtungszeit von 14 Tagen zu durchschnittlich 50% überlebten.

Der arithmetische Mittelwert aller nachgewiesenen Antitoxintiter betrug 0,19 AE/ml, wobei die einzelnen Größen in einem Bereich von (0,027—) 0,040—0,80 AE/ml variierten.

Die geringe Toleranz der mit Eiweiß vorbehandelten Ratten gegenüber den verwendeten Cytostatica veranlaßte uns, bei der Vorbehandlung auf eine zweite Injektion von Eiklar zu verzichten. Darüber hinaus war eine weitere Herabsetzung der Titerhöhe, wie Kienitz u. Mitarb.[10] diese bei eiweißvorbehandelten Tieren beobachtet hatten, zu vermeiden, wiewohl wir die Höhe der Einzeltiter bei unserer speziellen Fragestellung für unwesentlich hielten. Es sind daher in der Tab. 2 ohne Rücksicht auf die Titerhöhe unter den positiven Tieren alle jene aufgeführt, bei denen überhaupt Antitoxin nachweisbar war. Die Unterschiede zwischen den mit einem Cytostaticum behandelten Tieren und den unbehandelten, aber infizierten Kontrollen sind signifikant und sprechen eindeutig für eine Hemmung der Antikörperbildung durch die Cytostatica. Das Prednisolon dagegen hatte keinen Einfluß.

Zum besseren Verständnis der Deutung dieses Phänomens seien im folgenden die heute noch diskutierten Hypothesen zum Mechanismus der Antikörperbildung kurz aufgeführt. Nach Haurowitz[6] wird durch den Einfluß des Antigen die normale Synthese der Globuline in der Weise modifiziert, daß die neugebildeten Globuline der Konfiguration der Antigene angepaßt sind. In diesem Zusammenhang spricht Haurowitz von „chemischen Organisatoren" für die enzymatische Proteinsynthese, die in Übereinstimmung mit dem allgemeinen Proteinstoffwechsel des Organismus unter anderem vom allgemeinen Ernährungszustand, vom Stickstoffmetabolismus sowie vom Aminosäuregehalt der Nahrung wesentlich beeinflußt wird.

Eine besondere Rolle bei der Bildung der Antikörper scheint nach Sterzl[16] den Nucleoproteinen zuzukommen: er konnte beobachten, daß schon bei 5 Tage alten Kaninchen auf einen entsprechenden Antigenreiz Antikörper gebildet werden, wenn man diesen Tieren aus Zellen erwachsener immunisierter Kaninchen extrahierte Nucleoproteinfraktionen injiziert.

Tabelle 2. *Versuchsergebnisse der Haupt- und Kontrollgruppen. $K = 1$: Voraussage mit 68% Wahrscheinlichkeit; $x' - x''$: Mutungsgrenzen* (nach v. Schelling)

Injektionen	Zahl der Versuchstiere		Titer-positiv	%	Voraussage $K = 1$	
	zu Beginn	überlebend			x'	x''
Eiweiß	22	22	1	(4,5)	1,75	11,29
Eiweiß + Staphylokokken	22	21	9	(43)	32,62	53,74
Eiweiß+Endoxan	10	6	0	(0)	0,00	14,29
Eiweiß+Trenimon	10	10	0	(0)	0,00	9,09
Eiweiß+Prednisolon	10	10	1	(10)	3,89	23,38
Eiweiß+Staphylokokken+Endoxan	22	16	1	(6,2)	2,41	15,23
Eiweiß+Staphylokokken+Trenimon	22	22	2	(9,1)	4,62	17,12
Eiweiß+Staphylokokken+Prednisolon	22	21	9	(43)	32,62	53,74
keine	22	21	1	(4,8)	1,83	11,80

Die Modifizierung des enzymatischen Systems der Antikörperbildung wird gleichfalls von Burnet u. Fenner[3] postuliert, jedoch wird die Fähigkeit der Antikörperbildung auch auf Tochterzellen übertragen, so daß die weitere Antikörperbildung von der Anwesenheit des Antigen unabhängig ist.

Pauling[12] dagegen vermutet eine einheitliche, für Antikörper und „normale" Globuline gleiche Synthese, wobei das Antigen lediglich die Faltung der Peptidketten zu beeinflussen vermag; das enzymatische System bleibt also durch das Antigen unberührt.

Diese Auffassung ist im Hinblick auf unsere Versuchsergebnisse nur schwer verständlich; es müßte nämlich die spezifische Faltung der Peptidketten — wenn diese nicht auch enzymatisch gesteuert wäre — durch die Anwesenheit der Cytostatica gehemmt werden, zumal der cytostatische Effekt für eine entscheidende Hemmung der gesamten Globulinsynthese sicher nicht ausreichen dürfte. Man wird vielleicht nicht fehlgehen in der Annahme, daß auch hier der Angriffspunkt der Cytostatica in der Beeinflussung einer fermentativen Regulation zu

suchen ist, ohne allerdings den betreffenden Stoffwechselschritt sicher nennen zu können. Unter diesem Gesichtspunkt möchten wir auch die von Haurowitz, Burnet u. Fenner vertretenen Hypothesen zur Antikörperbildung für wahrscheinlicher halten.

Ein qualitativer Unterschied in der Wirksamkeit von Endoxan und Trenimon konnte nicht festgestellt werden: beide Cytostatica führten zu einer nahezu völligen Hemmung der Antikörperbildung. Dieses Resultat erscheint uns insofern von besonderer Bedeutung, als dem Endoxan eine in hohem Maße selektive Tumorwirkung zugesprochen und die Überführung der inaktiven Transport- in die Wirkform zumeist in den Tumor selbst verlegt wird[2].

Es ist nicht ausgeschlossen, daß am Orte erhöhter Stoffwechselaktivität — z.B. in einem Tumor — auch eine erhöhte Aktivierung des Endoxan stattfindet. Sicherlich ist diese Aktivierung aber kein Charakteristicum der malignen Zelle. Wir möchten in diesem Zusammenhange noch einmal auf die schon eingangs erwähnten „Nebenerscheinungen" bei cytostatischer Therapie hinweisen, denen unter anderem also auch die Hemmung der Antikörperbildung zuzurechnen ist.

Es könnte der Einwand erhoben werden, daß in unserer Versuchsanordnung das Fehlen von Antikörpern möglicherweise durch einen gewissen bakteriostatischen oder gar bactericiden Effekt dieser Zellgifte bedingt ist. In der Tat vermögen auch diese Substanzen, wenigstens in vitro, einen zum Teil recht erheblichen Einfluß auf den Bakterienstoffwechsel auszuüben*. Allerdings konnte bei keinem Versuchstier die Infektion durch Endoxan oder Trenimon verhindert werden, da sich die typischen Abscesse und Organveränderungen mit großer Regelmäßigkeit nachweisen ließen.

An dieser Stelle sei noch einmal auf die schon im methodischen Abschnitt erwähnte Abb. 1 hingewiesen: die Keimzahl der nach mehrstündiger Vorinkubation bei 37°C nunmehr eisgekühlten Bouillonkultur nimmt im Laufe 1 Std um etwa 10% ab. Daraus folgt, daß die letzten der zu einer Versuchsreihe gehörenden Tiere mit einer entsprechend geringeren Keimzahl infiziert werden. Diese Differenz scheint uns allerdings — bei der speziellen Fragestellung — hinsichtlich der Brauchbarkeit unserer Methodik von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Interessant ist dagegen der starke Bakterienzerfall in physiologischer NaCl, so wie er sich aus der Kurve *b* der Abb. 1 ergibt. Bei weiteren Messungen ließ sich ermitteln, daß sich durch steigenden Bouillonzusatz zur physiologischen NaCl die Überlebenszeit der Keime gleichsinnig verlängern läßt. Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß „physiologische" NaCl allein auch zur kurzfristigen Konservierung dieser Keime ein unbrauchbares Medium ist.

* Im Druck.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, ließ sich im Experiment bei der eiweißvorbehandelten Ratte die Antikörperbildung nach Staphylokokken-Infektion durch die Cytostatica Endoxan und Trenimon deutlich hemmen. Wenn man auch die in Tierexperimenten gewonnenen Beobachtungen nur mit großer Zurückhaltung auf die Verhältnisse im menschlichen Organismus übertragen soll, so ist dennoch die Möglichkeit eines solchen Effektes auch bei dem über einen längeren Zeitraum hin mit einem derartigen Medikament behandelten Patienten zu diskutieren. Dieser Gesichtspunkt erscheint uns daher nicht zuletzt angesichts des zunehmenden Hospitalismus und der steigenden Resistenz vieler Keime gegen bis dahin wirksame Chemotherapeutica von besonderer Bedeutung. Natürlich läßt die relativ kleine Zahl der Versuchstiere keine endgültige Deutung des hier festgestellten Phänomens und keine sichere Abschätzung des sich daraus ergebenden Ausmaßes der Folgen zu: so möchten wir denn auch unsere Arbeit als eine Anregung für weitere Versuche zu diesem aktuellen Problem verstanden wissen.

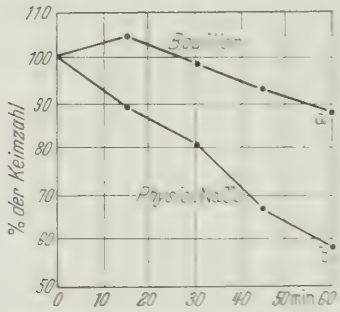


Abb. 1. Abhängigkeit der Keimzahl vom Inkubationsmedium (Staphylokokkenstamm Wood 46)

Zusammenfassung

Durch parenterale Applikation von heterologem Protein läßt sich die natürliche Resistenz der weißen Ratte gegenüber Staphylokokken-Infektionen durchbrechen. Nach Injektion von toxinbildenden Staphylokokkenkulturen sind im Serum der eiweißvorbehandelten Ratte die gegen das α-Toxin gerichteten Antikörper nachweisbar, deren Bildung durch Behandlung der Versuchstiere mit den cytostatisch wirksamen Substanzen Endoxan und Trenimon deutlich gehemmt wird.

Die Einzeldosis pro Injektion und Tier betrug für Endoxan 10 mg, für Trenimon 25 μg pro Kilogramm Körpergewicht.

Die Verabreichung von Prednisolon (3 mg/kg Körpergewicht pro Injektion und Tier) führte bei den Vergleichsgruppen zu keiner Hemmung der Antikörperbildung.

Die mögliche Wirkungsweise der Cytostatica wird im Zusammenhang mit der Besprechung der heute gültigen Hypothesen zur Antikörperbildung diskutiert; auf die Bedeutung eines nicht unwahrscheinlichen, ähnlichen Effektes auch beim Menschen, insbesondere bei einer über einen längeren Zeitraum sich hinziehenden Therapie, wird hingewiesen.

Literatur

[1] Braun-Falco, O.: Klinik und Pathomechanismus der Endoxan-Alopezie als Beitrag zum Wesen cytostatischer Alopezien. Arch. klin. exp. Derm. **212**, 194 (1960).

[2] Brock, N.: Zur Frage der selektiven Tumorwirkung von Endoxan. Méd. et Hyg. (Genève) **17**, 480 (1959).

[3] Burnet, F., and F. Fenner: The production of antibodies. 2nd edit. London: MacMillan and Co. 1949.

[4] Busch, H., and V. R. Potter: Cacer Res. **13**, 168 (1953).

[5] Gerhards, E., u. L. Lutzmann: Der Einfluß verschiedener Cytostatica auf den Cortisonabbau in der Rattenleber. Klin. Wschr. **39**, 1253 (1961).

[6] Haurowitz, F.: Antibodies. Their nature and formation. Lancet **1947**, 149.

[7] Ipsen, J.: A standard for antistreptolysin O of human serum and its practical application. Acta path. microbiol. scand. **21**, 203 (1944).

[8] Kienitz, M., u. J. Kümmel: Der Staphylokokken-antitoxintiter bei Neugeborenen und ihren Müttern. Z. Immun.-Forsch. **120**, 53 (1960).

[9] Kienitz, M., W. Ritzerfeld, W. Hüther u. J. Rath: Tierexperimentelle Studien zum Problem der natürlichen Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen. IV. Mitteilung. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 159 (1961).

[10] Kienitz, M., W. Ritzerfeld u. R. Sebers: Tierexperimentelle Studien zum Problem der natürlichen Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen. I. Mitteilung. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 15 (1960).

[11] Kienitz, M., W. Ritzerfeld u. R. Sebers: Tierexperimentelle Studien zum Problem der natürlichen Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen. II. Mitteilung. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 28 (1960).

[12] Pauling, L.: A theory of the structure and process of formation of antibodies. J. Amer. chem. Soc. **62**, 2640 (1940).

[13] Pütter, J.: Unsere heutigen Kenntnisse über die Wirkungsweise cytostatischer Substanzen. Ther.-Ber. **32**, 255 (1960).

[14] Pütter, J.: Stoffwechselwirkungen des Tris-Äthylenimino-p-benzochinons. Symposion aktueller ther. Probleme. Stuttgart: Enke 1960.

[15] Ritzerfeld, W., M. Kienitz u. R. Neuhaus: Tierexperimentelle Studien zum Problem der natürlichen Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen. III. Mitteilung. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 488 (1961).

[16] Sterzl, J., and C. Hrubesova: The transfer of antibody formation by means of nucleo-protein fractions to nonimmunized recipients. Folia biol. (Kraków) **2**, 21 (1956).

Dr. Ludger Lutzmann,
Hygiene-Institut der Westf. Wilhelms-Universität, 44 Münster i.W., Westring 10

Zeitschrift f. Hygiene 148, 466—475 (1962)

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. med. Curt Sonnenschein)

Cryptococcus neoformans und Guizotia abyssinica (syn. G. oleifera D. C.)

(Farbreaktion für Cr. neoformans)

Von
F. Staib

Mit 4 Textabbildungen, davon 3 farbigen

(Eingegangen am 24. März 1962)

Cryptococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin, der Erreger der meist tödlich verlaufenden Cryptococcose (Torulose oder Europäische Blastomykose genannt) des Menschen, wurde im Jahre 1955 von Ch. W. Emmons erstmals aus Taubenmist isoliert[3]. F. Staib gelang im Jahre 1961 der kulturelle Nachweis von Cr. neoformans und anderen Cryptococcus-Arten aus Kot und Käfigsand von Stubenvögeln[7,11].

Bei Untersuchungen zur Frage „Vogelkot als Nährsubstrat für Cryptococcus-Arten" stellte ich fest, daß sich bei Verwendung von Kanarienvogelkotpulver als einziger N-Quelle bei der Assimilationsprüfung nach dem Benhamschen Platten-Ausstrichverfahren von sämtlichen Cryptococcus-Arten nur die Kolonien von Cr. neoformans innerhalb von 2 bis 3 Tagen intensiv braun verfärben[1,2].

Da das Erkennen von Cr. neoformans-Kolonien in einem Sproßpilzmischrasen sehr erschwert ist, wäre es eine große Hilfe, insbesondere für den Routinebetrieb eines Mikrobiologischen Laboratoriums, Cr. neoformans-Kolonien durch spezifische Verfärbung auf einem Nährboden innerhalb weniger Tage erkennen zu können.

Über Auffinden und Vorkommen eines bisher nur bei Cr. neoformans-Kolonien farbreagierenden Stoffes soll hier berichtet sein.

Eigene Untersuchungen

Methodik. Im Differenzierungsgang der Hefen und hefeähnlichen Pilze stellt die Stickstoff- und Kohlenhydrat-Assimilationsprüfung einen besonderen Bestandteil dar. Nachdem die hier zu besprechenden Beobachtungen im Rahmen der N-Assimilationsprüfung von Vogelkot als einziger N-Quelle gemacht wurden, sei zu Beginn auf die Herstellung des hierbei verwendeten Grundsubstrates hingewiesen[1,2,6,9,10].

In dem Grundsubstrat nach L. J. Wickerham (modifiziert nach H. Seeliger) wurde Kaliumnitrat (als einzige Stickstoffquelle) ersetzt durch getrockneten, pulverisierten Kot verschiedener Vogelarten[6]. Der Vogelkot wurde im Exsiccator über Calciumchlorid getrocknet und im Mörser pulverisiert. Das mit Hilfe eines

Perlonsiebes (Maschenweite 0,15 mm) erhaltene Siebgut wurde für 2 Std im Sterilisator bei einer Temperatur von 80° C belassen. Auch luftgetrockneter Vogelkot kann ebenso verwendet werden.

Herstellung des Grundsubstrates (mit Vogelkotzusatz)

Dextrose	10,0 g	Inositol	0,3 g
Vogelkotpulver (an Stelle von 0,78 g Kaliumnitrat)	10,0 g	Para-Aminobenzoesäure	0,05 g
		Vitaminlösung „Protovit"*	2,5 ml
KH_2PO_4	1,0 g	Agar	15,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Aqua dest.	1000,0 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1 g		
NaCl	0,1 g		

Wasserstoffionenkonzentration p_H 7,0.

Die Bestandteile, ausgenommen die Vitaminlösung, werden in Aqua dest. gelöst und nach Zugabe des gewaschenen Agars 15 min im Autoklaven auf 110° C erhitzt. Die Vitaminlösung wird dem kochendheißen Medium zugesetzt. Das fertige Substrat wird in Petri-Schalen ausgegossen.

Verwendung: Eine Normalöse einer 24 Std alten Sproßpilzkultur wird in 1 ml Aqua dest. aufgeschwemmt. Eine Öse dieser Aufschwemmung wird auf der Nährbodenoberfläche ausgestrichen und bei einer Temperatur von 26° C belassen. Die Wachstumsbeurteilung erfolgt nach 3—4 Tagen. Als Kontrolle diente bei den im folgenden zu besprechenden Untersuchungen das Grundsubstrat ohne und mit Zusatz von 0,078% Kaliumnitrat.

Braunfärbung von Cr. neoformans-Kolonien bei der N-Assimilationsprüfung mit Zusatz von Vogelkot als N-Quelle

Wie bereits von mir berichtet, ergab die Assimilationsprüfung nach dem Benhamschen Platten-Ausstrichverfahren bei Verwendung von pulverisiertem Vogelkot (0,078%) als einziger N-Quelle (an Stelle von

Tabelle 1

Kotpulver folgender Vogelarten	Braunfärbung der Kolonien von *Cryptococcus*						
	neoformans	albidus	diffluens	luteolus	laurentii	gastricus	terreus
Kanarienvogel (Serinus canaria)	+	–	–	–	–	–	–
Stieglitz (Carduelis carduelis)	+	–	–	–	–	–	–
Dompfaff (Pyrrhula pyrrhula)	+	–	–	–	–	–	–
Wellensittich (Melopsittacus undulatus)	–	–	–	–	–	–	–
Taube (Columba livia)	–	–	–	–	–	–	–
Kormoran (Phalacrocorax carbo)	–	–	–	–	–	–	–

Zeichenerklärung: + Braunfärbung der Kolonien; – keine Braunfärbung der Kolonien.

* „Protovit"-Vitaminlösung von Hoffmann-La Roche, Grenzach/Baden.

0,078% Kaliumnitrat) bei sämtlichen geprüften Cryptococcus-Arten dieselben günstigen Wachstumsergebnisse wie etwa bei Verwendung von Harnstoff oder Harnsäure als N-Quelle[9,10]. Wurden aber dem Grundsubstrat 1,0% Kanarienvogelkotpulver als N-Quelle zugesetzt, so konnte bei den Kolonien von Cr. neoformans eine intensive Braunfärbung nach 2–4tägigem Belassen bei einer Temperatur von 26°C beobachtet werden.

Diese Feststellung veranlaßte zur Prüfung von Kot verschiedener Vogelarten unter den gleichen Bedingungen (siehe Tab. 1).

Besprechung der Ergebnisse. Wie die Ergebnisse zeigen, führt auch die Verwendung von Kot der Vogelarten Stieglitz und Dompfaff zur Braunfärbung der Cr. neoformans-Kolonien. Die Verfärbung blieb dagegen aus bei Verwendung des Kotpulvers von Taube, Wellensittich und Kormoran. Die Nachprüfung des Futters der aufgeführten Vogelarten ergab, daß Kanarienvogel, Stieglitz und Dompfaff mit derselben Körnermischung gefüttert werden, und zwar handelt es sich hierbei um besonders ölhaltige Samen wie Hanfsamen (Cannabis sativa), Leinsamen (Linum sativum), Rübsen (Brassica rapa), Kanariensaat (Phalaris canariensis), Mohn (Papaver somniferum), geschälten Hafer (Avena sativa) und Negersaat (Guizotia abyssinica). Im Futter von Taube, Wellensittich und Kormoran sind diese genannten Samen, insbesondere die Negersaat, nicht enthalten.

Diese Feststellung veranlaßte mich, das Körnerfutter in pulverisierter Form ebenso wie das Kotpulver dem Assimilations-Grundsubstrat als einzige N-Quelle zuzusetzen.

Braunfärbung von Cr. neoformans-Kolonien bei der N-Assimilationsprüfung mit Zusatz von Vogelfutter (Pflanzensamen) als N-Quelle

Methodik. Im Starmix wurden die oben aufgeführten Pflanzensamen einzeln feinst zerkleinert und 5,0%ig dem heißen Grundsubstrat, wie oben beschrieben, zugesetzt und anschließend 15 min im Autoklaven auf 100° C erhitzt und darauf in sterile Petri-Schalen gegossen. Die Beimpfung der Nährböden erfolgte wie oben.

Tabelle 2

Pflanzensamen-Arten	Braunfärbung der Kolonien von *Cryptococcus*						
	neoformans	albidus	diffluens	luteolus	laurentii	gastricus	terreus
Hanfsamen	—	—	—	—	—	—	—
Leinsamen	—	—	—	–	–		—
Rübsen	—	—		–	—	—	—
Kanariensaat	—	—	—	—	—	—	–
Mohn	—	—	—	—	—	—	—
Geschälter Hafer	—	—	—	—	–	—	—
Negersaat	–	—	—	–	—	–	—

Zeichenerklärung siehe Tab. 1.

Besprechung der Ergebnisse. Nur bei der N-Assimilationsprüfung mit Negersaat-Zusatz als einziger N-Quelle konnte dieselbe Braunfärbung von Cr. neoformans-Kolonien wie bei Verwendung von Kot der diese Pflanzensamen verzehrenden Vogelarten beobachtet werden. Diese Feststellung führte zu dem im folgenden beschriebenen Kontrollversuch.

Kanarienvogelfutter ohne Negersaat

Dem vorausgegangenen Ergebnis zufolge lag es nahe, den Kanarienvogel ohne Negersaat weiterzufüttern. Zu diesem Zweck wurden zwei Kanarienvögel über 1 Woche mit dem üblichen Kanarienvogel-Mischfutter *ohne Negersaat* gefüttert. Der Kot dieser Tiere wurde gesammelt und ebenso wie bei vorausgegangenen Versuchen dem N-Assimilations-Grundsubstrat zugesetzt.

Ergebnis. Bei den auf diesem Substrat sich üppig entwickelnden Cr. neoformans-Kolonien blieb die Braunfärbung aus.

Mit dieser Beobachtung wurde bewiesen, daß es sich bei diesem farbreagierenden Stoff um einen Bestandteil der Negersaat (Frucht von Guizotia abyssinica) handelt, der den Darmkanal dieser Tiere unbeschadet passiert.

Negersaat (Frucht von Guizotia abyssinica)

Die Komposite Guizotia abyssinica (syn. G. oleifera D. C.) ist in Abessinien heimisch und wird auch in Ostindien angebaut. Die Früchte dieser Komposite sind genannt Negersaat, Niggersaat, Ramtillasamen und Nigerseed (engl.), (siehe Abb. 1).

Abb. 1. Negersaat, Früchte der Komposite Guizotia abyssinica, besonders charakterisiert durch die schwarze Farbe (Originalgröße)

Die Negersaat enthält zu 35—40% ein trocknendes Öl, bestehend aus Glyceriden der Öl-, Linol-, Palmitin- und Myristin-Säure. Dieses Öl wird als Speise- und Brennöl verwendet. Die Preßrückstände, die sogenannten Niggerkuchen, finden als Futtermittel Verwendung. Außer dem weiteren Verwendungszweck als Vogelfutter ist in der Literatur nichts vermerkt[4,12].

Wäßriger Auszug und Filtrat von Negersaat

Da bei Verwendung von Vogelkotpulver im N-Assimilations-Grundsubstrat der Farbeffekt bei Cr. neoformans zu beobachten war, ist anzu-

nehmen, daß es sich bei diesem farbreagierenden Stoff um eine wasserlösliche Substanz handelt. Demzufolge muß auch die Gewinnung dieses Stoffes in Form eines wäßrigen Auszuges und Filtrates von der Negersaat direkt möglich sein.

Methodik. Negersaat wurde im Starmix möglichst fein zerkleinert; hiervon wurden 60 g in 300 ml Aqua dest. gebracht und das Ganze 10 min im Autoklaven auf 100° C erhitzt. Anschließend wurde durch einfachen Papierfilter filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde zum N-Assimilations-Grundsubstrat (nach Wickerham) gegeben. Die Substanzen für 1000 ml Grundsubstrat (Rezept siehe S. 467) wurden für diesen Versuch nur in 800 ml Aqua dest. gebracht und 20 min auf 110° C erhitzt. Zu diesen 800 ml heißen Grundsubstrates wurden 200 ml des oben beschriebenen Negersaat-Filtrates gegeben und das Ganze anschließend 10 min auf 100° C erhitzt, dann in Petri-Schalen gegossen. Um festzustellen, ob der Farbeffekt in Abhängigkeit von einem Vitaminzusatz steht, wurde das oben beschriebene Substrat mit und ohne Protovit-Zusatz hergestellt.

Besprechung der Ergebnisse. Auf dem N-Assimilations-Substrat bei Negersaat-Filtrat-Zusatz als einziger N-Quelle kommt es bei den Cr. neoformans-Kolonien nach 2—3tägiger Bebrütung bei einer Temperatur von 26° C zu einer intensiveren Braunfärbung als etwa bei Verwendung von Kotpulver solcher mit Negersaat gefütterten Vögel.

Weiterhin zeigte der Versuch, daß dieser wasserlösliche, farbreagierende Stoff nicht hitzeempfindlich ist.

Ebenfalls wurde festgestellt, daß auch ohne Zusatz der Vitaminlösung Protovit die Braunfärbung der Cr. neoformans-Kolonien eintritt.

Folgende Sproßpilz-Arten wurden auf Braunfärbung geprüft

Gattung Cryptococcus

a) Cr. neoformans: Stämme von F. Staib, Würzburg: W 71/61, M 7/61, F 63b/61, M 106a/61, Me 9/61, Me 7/61, M 9/61, G 21/61.
E. E. Evans, Michigan/USA: 1/57.
Hôpital St. Louis, Lab. de Sabouraud, Paris: 1/56.
E. Kröger, Göttingen: „Helle"/56.
H. Scholer, Basel/Schweiz: H 108, H 112, H 192; weitere, von H. Scholer überlassene Stämme sind verschiedenster Herkunft und zwar:
N. F. Conant, Durham/USA: Original „Busse"-Stamm H 138, „Cr. neoformans var. innocuosus" H 140, H 141;
Pasteur Institut, Paris: H 392, H 393;
H. Rieth, Hamburg: H 191.
N. J. W. Kreger-van Rij, Delft/Holland: CBS 132, CBS 879.
S. Windisch, Berlin: „Cr. neoformans var. uniguttulatus" 8/62.

b) Cr. albidus: Stämme von F. Staib, Würzburg: C 2/61, M 21/61, C 8a/61, M 30/61, M 50/61, St 69/61.
H. Scholer, Basel/Schweiz: H 422, H 421.

c) Cr. diffluens: Stämme von F. Staib, Würzburg: U 10/61, W 3/61, W 22/61, C 10/61, C 11/61, G 12/61, Z 5/61, M 104/61, M 13b/61.
H. Scholer, Basel/Schweiz: H 134, H 253, H 348, H 365.

d) Cr. laurentii: Stämme von F. Staib, Würzburg: 139a/61.
N. J. W. Kreger-van Rij, Delft/Holland: CBS 920.

e) Cr. luteolus: Stamm von N. J. W. Kreger-van Rij, Delft/Holland: CBS 943.
f) Cr. gastricus: Stamm von M. di Menna, Lower Hutt/Neuseeland: Original-Stamm/61.
g) Cr. terreus: Stamm von M. di Menna, Lower Hutt/Neuseeland: Original-Stamm/61.

Von weiteren Sproßpilz-Arten wurden folgende Stämme geprüft:

1. *Gattung Candida:*
   a) Candida albicans — Stamm von F. Staib, Würzburg 1169/62
   b) Candida krusei — Stamm von F. Staib, Würzburg 1859/59
   c) Candida tropicalis — Stamm von F. Staib, Würzburg 1824/59
   d) Candida pseudotropicalis — Stamm von F. Staib, Würzburg 1374/59
2. *Gattung Torulopsis:*
   a) Torulopsis candida — Stamm von N. J. W. Kreger-van Rij, Delft/Holland CBS 940
   b) Torulopsis aeria — Stamm von N. J. W. Kreger-van Rij, Delft/Holland CBS 155
3. *Gattung Rhodotorula:*
   a) Rhodotorula mucilaginosa — Stamm von F. Staib, Würzburg 6620/56
   b) Rhodotorula rubra — Stamm von F. Staib, Würzburg 8659/56
4. *Gattung Trichosporon:*
   a) Trichosporon cutaneum — Stamm von F. Staib, Würzburg 3580/60
5. *Gattung Lipomyces:*
   a) Lipomyces starkeyi — Stamm von N. J. W. Kreger-van Rij, Delft/Holland CBS 1807
   b) Lipomyces lipoferus — Stamm von N. J. W. Kreger-van Rij, Delft/Holland CBS 944

Ergebnis. Sämtliche aufgeführten Cr. neoformans-Stämme verschiedenster Herkunft entwickelten sich auf dem N-Assimilations-Agar bei Zusatz von Negersaat-Filtrat oder Negersaat-Pulver in Form braungefärbter Kolonien. Alle bisher geprüften Stämme der übrigen Cryptococcus-Arten zeigten dagegen diese Braunfärbung nicht. Somit ist dieser Farbeffekt innerhalb der Gattung Cryptococcus charakteristisch für die Species Cr. neoformans.

Da auch die bisher geprüften Stämme anderer, häufiger Sproßpilz-Arten ebenfalls keine Braunfärbung auf Negersaat (-Pulver oder -Filtrat)-haltigem Substrat zeigen, ist die Braunfärbung nach bisheriger Prüfung als spezifisch für Cr. neoformans zu betrachten.

Zur praktischen Verwertbarkeit der Braunfärbung von Cr. neoformans-Kolonien durch Negersaat

Praktisches Beispiel. Auf einen N-Assimilations-Agar mit einem Zusatz von 1% Kanarienvogelkotpulver als einziger N-Quelle wurde eine Aufschwemmung fünf verschiedener Sproßpilz-Arten (Cr. neoformans W 71, Cr. albidus, Cr. diffluens, Candida albicans und C. tropicalis) ausgespatelt. Die beimpften Nährböden wurden 5 Tage bei einer Temperatur von 26° C belassen und täglich beurteilt. Schon nach 2 Tagen konnte bei

einzelnen Kolonien eine beginnende Braunfärbung beobachtet werden, die am 4.—5. Tag ihre höchste Intensität erreicht hatte.

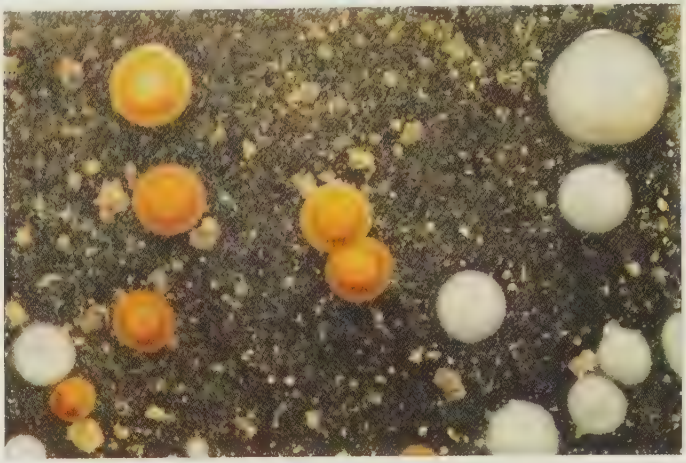


Abb. 2. Ausschnitt aus einer Mischkultur verschiedener Sproßpilz-Arten auf N-Assimilations-Agar bei Kanarienvogelkot-Zusatz als einziger N-Quelle. *Im Bild.* Die braunen Kolonien sind Cr. neoformans (Stamm W 71), die weißen Kolonien sind Cr. albidus und Candida albicans. Beurteilt nach 4 Tagen/26° C. Abb. 2—4. ca. achtfache Vergrößerung

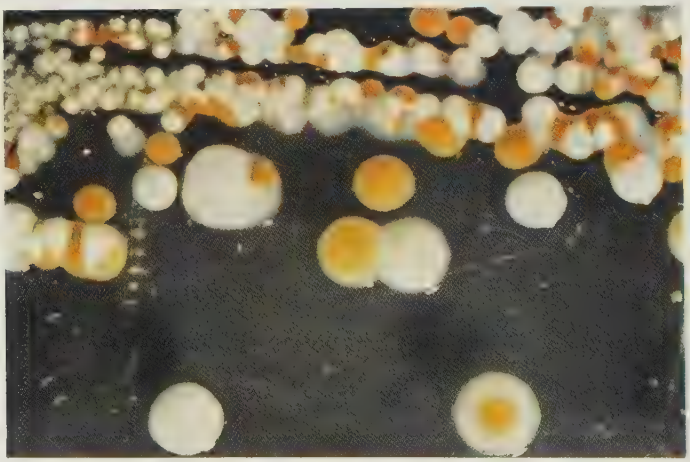


Abb. 3. Sproßpilz-Kolonien-Mischrasen auf N-Assimilations-Agar bei Zusatz von 1% Kanarienvogelkot-Filtrat (Seitz EKS-Filter) als einziger N-Quelle. Von den fünf Sproßpilz-Arten Cr. neoformans, Cr. albidus, Cr. diffluens, Candida albicans und C. tropicalis sind nur die Kolonien von Cr. neoformans (Stamm W 71) intensiv braun gefärbt und somit innerhalb des Kolonien-Mischrasens deutlichst erkennbar

Bei den braunen Kolonien handelte es sich nur um *Cr. neoformans.* Die Kolonien der übrigen vier ausgeimpften Sproßpilz-Arten entwickelten sich artspezifisch und unverfärbt (siehe Abb. 2, 3 und 4).

Über die Verwertbarkeit der farbreagierenden Substanz von Negersaat bei den verschiedenen Pilznährböden wird in einer weiteren Mitteilung berichtet.

Diskussion

In der mykologischen Diagnostik stehen dem Untersucher bis heute noch keine Differentialnährböden, wie etwa in der bakteriologischen Diagnostik, zur Verfügung. Die Untersuchungsmaterialien werden meist auf Bierwürze- oder Sabouraud-Dextrose-Agar überimpft. Aus dichtesten Kolonienrasen, bestehend aus den verschiedensten Sproßpilz-Arten, ist

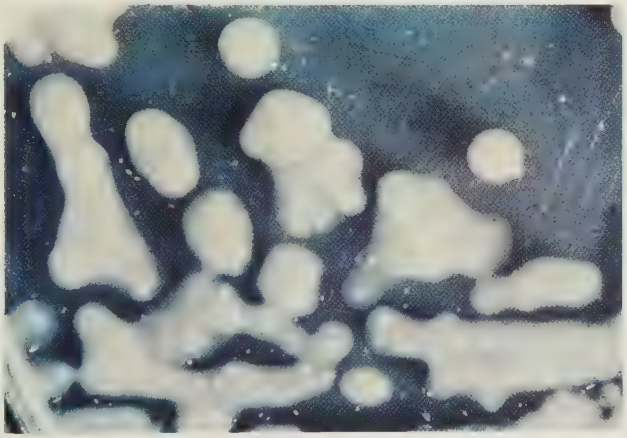


Abb. 4. Kolonien von Cr. neoformans (Stamm W 71), Cr. albidus und Cr. diffluens auf N-Assimilations-Agar mit 1% Taubenkot-Filtrat-Zusatz als einziger N-Quelle. *Im Bild.* Die runden, alleinstehenden Kolonien sind Cr. neoformans (Stamm W 71), es besteht kein Unterschied in der Kolonienfarbe der drei Cryptococcus-Arten

es dem Auge des Untersuchers überlassen, die Weiterdifferenzierung einzelner Kolonien vorzunehmen. Innerhalb der anaskoporogenen Hefen ist der Erreger der menschlichen, meist tödlich verlaufenden Cryptococcose, Cryptococcus neoformans, von besonderem Interesse.

Das Kolonienbild, insbesondere der nichtmukösen Wuchsform von Cr. neoformans, kann mit dem verschiedenster apothogener Sproßpilz-Arten verwechselt werden, was sicher häufig die Ursache des Nichterkennens einer Cryptococcose sein dürfte. Es wäre somit von nicht geringer Bedeutung, diese Species für jeden Untersucher auf einem Spezial-Nährboden von anderen, ähnlichen Pilzen unterscheidbar zu machen.

Meinen bisherigen Untersuchungen zufolge enthält die Negersaat, d.s. die Früchte von Guizotia abyssinica, eine farbreagierende Substanz, die nur bei Cr. neoformans zu einer intensiven Braunfärbung der Kolonien führt.

Mit Cr. neoformans-Stämmen verschiedenster Herkunft, einschließlich des „Busse"-Original-Stammes aus dem Jahre 1894, konnte ich diese Beobachtung bestätigt finden.

Da dieser Farbeffekt bei den bisher geprüften Stämmen der übrigen Arten der Gattung Cryptococcus nicht festgestellt werden konnte, muß der Species Cr. neoformans ein innerhalb der Gattung Cryptococcus bisher noch unbekanntes Fermentsystem eigen sein.

Im Jahre 1962 wurde von F. Staib erstmals berichtet, daß die Assimilierbarkeit von *Kreatinin* ebenfalls nur bei Cr. neoformans-Stämmen, nicht aber bei Stämmen der übrigen Arten der Gattung Cryptococcus zu beobachten ist[9,10].

Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der Kreatinin-Verwertbarkeit und der farbreagierenden Substanz von Negersaat (Guizotia abyssinica) bei Cr. neoformans.

Über die praktische Verwertbarkeit der farbreagierenden Substanz von Negersaat bei Cr. neoformans für die mykologische Diagnostik wird in einer zweiten Mitteilung berichtet.

Zusammenfassung

1. Bei der sogenannten N-Assimilationsprüfung nach dem Benhamschen Platten-Ausstrichverfahren unter Verwendung des Wickerhamschen Grundsubstrates (modifiziert nach H. Seeliger) kommt es bei Zusatz von Kanarienvogel (Serinus canaria)-Kotpulver (1%), als einziger N-Quelle, zu einer intensiven Braunfärbung der sich hierauf üppig entwickelnden Cr. neoformans-Kolonien.

2. Dieser Farbeffekt konnte ebenfalls bei Verwendung von Kotpulver von Dompfaff (Pyrrhula pyrrhula) und Stieglitz (Carduelis carduelis) beobachtet werden, nicht dagegen bei Verwendung von Kotpulver von Taube (Columba livia), Wellensittich (Melopsittacus undulatus) und Kormoran (Phalacrocorax carbo).

3. Es wurde festgestellt, daß es sich bei der Futterzusammenstellung für Kanarienvogel, Stieglitz und Dompfaff um dieselben Pflanzensamen handelt und zwar: Hanfsamen (Cannabis sativa), Leinsamen (Linum sativum), Rübsen (Brassica rapa), Kanariensaat (Phalaris canariensis), Mohn (Papaver somniferum), geschälter Hafer (Avena sativa) und Negersaat (Guizotia abyssinica).

4. Zusatz der pulverisierten bzw. gequetschten oben aufgeführten Pflanzensamen zum N-Assimilations-Substrat als einziger N-Quelle ergab nur bei Negersaat-Zusatz eine intensive Braunfärbung der sich hierauf entwickelnden Cr. neoformans-Kolonien.

5a. Auf N-Assimilations-Grundsubstrat, mit Zusatz von zerkleinerter Negersaat oder wäßrigem Negersaat-Filtrat als einziger N-Quelle, kam es zur *Braunfärbung von insgesamt 23 Cr. neoformans-Stämmen* verschiedenster Herkunft.

5b. Keine Braunfärbung der Kolonien wurde beobachtet bei insgesamt 26 Stämmen der übrigen Cryptococcus-Arten wie Cr. albidus, Cr. diffluens Cr. laurentii, Cr. luteolus, Cr. gastricus und Cr. terreus.

5c. Ebenfalls konnte keine Braunfärbung festgestellt werden bei insgesamt elf Stämmen (bzw. Arten) der Gattungen Candida, Torulopsis, Rhodotorula, Trichosporon und Lipomyces.

6. Der nach bisherigen Untersuchungen nur mit Cr. neoformans farbreagierende Stoff von Negersaat ist wasserlöslich und unempfindlich gegenüber Temperaturen von 110° C.

7. Über die Verwertbarkeit der farbreagierenden Substanz von Negersaat bei den verschiedenen Pilznährböden wird in einer weiteren Mitteilung berichtet.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, den sehr verehrten Kollegen für die Überlassung der in dieser Arbeit verwendeten Pilzstämme meinen Dank auszusprechen.

Literatur

[1] Benham, Rh.: The genus Cryptococcus: the present status and criteria for the identification of species. Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II, **17**, 418—429 (1955).

[2] Benham, Rh.: The genus Cryptococcus. Bact. Rev. **20**, 189—196 (1956).

[3] Emmons, Ch. W.: Saprophytic sources of Cryptococcus neoformans associated with the pigeon (Columba livia). Amer. J. Hyg. **62**, 227—232 (1955).

[4] Hoppe, H. A.: Drogenkunde, 7. Aufl. Hamburg: Cram, de Gruyter & Co. 1958.

[5] Lodder, J., and N. J. W. Kreger-van Rij: The Yeasts, A taxonomic study. Amsterdam: North Holland Publ. Comp. 1952.

[6] Seeliger, H.: Das kulturell-biochemische und serologische Verhalten der Cryptococcus-Gruppe. Ergebn. Mikrobiol. Immunitätsforsch. exp. Ther. **32**, 23—72 (1959).

[7] Staib, F.: Vorkommen von Cryptococcus neoformans im Vogelmist. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **182**, 562—563 (1961).

[8] Staib, F.: Cryptococcus neoformans beim Kanarienvogel. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **185**, 129—134 (1962).

[9] Staib, F.: Vogelkot, ein Nährsubstrat für die Gattung Cryptococcus. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. (im Druck) (1962).

[10] Staib, F.: Zum Vorkommen von Cryptococcus-Arten bei Stubenvögeln. Vortrag vor der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft am 18. März 1962, Hamburg.

[11] Staib, F.: Zur Epidemiologie und Diagnose der Cryptococcose (Torulose). Habilitationsschrift. Würzburg 1962.

[12] Wiesner, J. v.: Die Rohstoffe des Pflanzenreichs, 4. Aufl., Bd. I. Leipzig: Engelmann 1927.

Priv.-Doz. Dr. Dr. F. Staib,
Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität,
87 Würzburg, Joseph Schneider-Str. 2

Zeitschrift f. Hygiene 148, 476—490 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. R. Haas)

Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren*

III. Mitteilung

Das Verhalten der Poliovirusstämme Mahoney und LSc, 2ab bei der Elution von Aluminiumhydroxyd als stabiles Virusmerkmal

Von
R. Thomssen und G. Maass

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. März 1962)

Robbins u. Mitarb.[8,11] beschrieben ein unterschiedliches Verhalten der Poliovirusstämme Mahoney und LSc, 2ab bei der Elution von Aluminiumhydroxyd. Stamm Mahoney eluierte sehr leicht bei einem neutralen bis schwach alkalischen Milieu, während nur eine sehr geringe Menge des adsorbierten Stammes LSc, 2ab unter gleichen Bedingungen eluiert wurde. Wir konnten kürzlich nachweisen, daß das unterschiedliche Verhalten der genannten Virusstämme bei der Elution in einer bestimmten Beziehung zu der bei der Elution verwendeten Konzentration sekundärer Phosphationen steht: Bei dem Stamm Mahoney genügt eine geringere Konzentration an sekundären Phosphationen, um die Elution des adsorbierten Virus quantitativ herbeizuführen als bei dem Stamm LSc, 2ab. Um verschiedene äußere Faktoren, die einen Einfluß auf die Lage des Elutionsmaximums ausüben können, zu eliminieren, haben wir versucht, eine Trennung beider Virusstämme aus einem künstlichen Gemisch heraus durchzuführen. Die Trennung gelang mit Hilfe sukzessiv ansteigend konzentrierter Phosphatlösungen mit einer für die Beweisführung genügenden Schärfe[3,5,9,10].

Diese Befunde sollen in der vorliegenden Arbeit ergänzt werden. Auf der einen Seite haben wir untersucht, ob die Differenz im Verhalten der beiden Virusstämme Mahoney und LSc, 2ab auch bei Verwendung anderer Anionen als Phosphationen im Elutionsmilieu und bei Verwendung anderer Adsorbentien in Erscheinung tritt, um auf diese Weise das unterschiedliche Verhalten als Ausdruck einer Viruseigenschaft schärfer herauszuarbeiten. Weiterhin haben wir untersucht, ob das charakteristische Verhalten bei der Elution in der Nachkommenschaft der beiden

* Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Virusstämme nach Passage in Gewebekulturen und nach Passage durch den menschlichen Intestinaltrakt erhalten bleibt, ob es also Ausdruck genetisch determinierter Eigenschaften der Virusstämme ist.

Material und Methoden

1. Virusmaterial. a) Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney: Es handelt sich um einen Virusstamm, den wir von Dr. Salk erhielten, der allerdings als Laborstamm mehrfach über Affennierengewebekulturen passiert worden ist und somit gegenüber dem Prototypstamm einige Abweichungen aufweisen kann. b) Poliovirus Typ 1, Stamm LSc, 2ab: Diesen Virusstamm erhielten wir von Dr. Sabin. Es handelt sich um die zweite Gewebekulturpassage eines Materials, welches in vielen oralen Impfversuchen, unter anderem in dem kürzlich publizierten[2], Anwendung gefunden hat. c) Poliovirusstämme des serologischen Typs 1, welche nach oraler Impfung mit LSc, 2ab aus dem Stuhl der Impflinge isoliert wurden. Die Isolierungstechnik ist an anderer Stelle[2] ausführlich wiedergegeben. Details werden, soweit sie für die nachstehenden Untersuchungsergebnisse von Belang sind, im nachstehenden Text erwähnt.

2. Adsorbentien. Es wurden die gleichen Aluminiumhydroxydpräparate wie in den früheren Untersuchungen verwendet[3]. Zusätzlich untersuchten wir die Adsorption der Virusstämme Mahoney und LSc, 2ab an folgenden Stoffen: Kieselgel (Merck Nr. 7731), Aluminiumoxyd (Merck 1090) und Calciumhydroxylapatit (hergestellt nach den Angaben von Tiselius et al. in [1]).

3. Adsorption und Elution wurden wieder ein- oder mehrstufig in Zentrifugenröhrchen vorgenommen, flüssige und feste Phase wurden nach bestimmten Adsorptions- bzw. Elutionszeiten durch Zentrifugieren getrennt. Alle Untersuchungen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

4. Viruskonzentrationsbestimmungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, im Röhrchentest auf Affennierengewebekulturen durchgeführt. Verdünnungsstufen in $\log_{10}$. Besetzung der Stufen mit 4—6 Röhrchen. Die Berechnung der Titer erfolgte auf Grund der Ablesung am 7. Tag nach Beimpfung nach dem Vorgehen von Reed und Muench.

Ergebnisse

1. Die Elution des Poliovirus Typ 1, Stämme Mahoney und LSc, 2ab von Aluminiumhydroxyd durch verschiedene Anionen.

Die eluierende Wirkung auf die an Aluminiumhydroxyd adsorbierten Polioviren ist keine spezifische Funktion von Phosphaten, sondern kommt einer ganzen Reihe von Salzen zu. Tab. 1 gibt das Ergebnis eines Versuches wieder, in welchem die Elutionswirkung verschiedener Anionen bei einem p_H-Wert von 7,5 miteinander verglichen wird.

Technik des Versuches zu Tab. 1. *Virus.* Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, 1:10 in aq. bidest. verdünnt. Adsorbens: Aluminumhydroxyd 1%ig; Adsorption: 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virus, p_H 7,0 AD (Adsorptionsdaunr): Elution 15 min; (einstufiges Verfahren: je 5 ml von 0,01 m, 0,02 m und 0,1 m Salzlösungen, deren p_H-Wert von 7,5 mit NaOH eingestellt und elektrometrisch überprüft wurde. Es wurden benutzt: Dinatriumhydrogenphosphat, Diammoniumhydrogenphosphat, Dinatriumarsenat, Trinatriumcitrat, Dinatriumsalz der Äthylendiaminotetraessigsäure, Natriumbicarbonat, Natriumoxalat, Natriumchlorid, Natriumfluorid, Ammoniumsulfat, Trihydroxymethylaminomethan, Natriumacetat. ED (Elutionsdauer): 15 min.

Den Daten der Tab. 1 kann unmittelbar entnommen werden, daß unter den Bedingungen des Versuches insbesondere Arsenat, Citrat und AeDTA in geringer Konzentration Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, eluieren, andere Ionen besitzen eine solche Wirkung im Bereich der von uns verwendeten Konzentrationen nicht. Ändert

Tabelle 1. *Die Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, von Aluminiumhydroxyd durch verschiedene Ionen bei p_H 7,5*

Ionen in der Elutionsflüssigkeit	Viruskonzentration ($\log_{10}ID_{50}$/ml)				
	vor der Adsorption	nach der Adsorption	nach der Elution		
			0,01 m	0,02 m	0,1 m
Na_2HPO_4	6,8	4,3	6,8	7,0	6,8
$(NH_4)_2HPO_4$	6,8	4,3	6,0	6,5	6,3
Na_2HAsO_4	6,5	4,5	6,5	6,5	6,3
AeDTA	7,0	4,0	—	6,3	7,3
$C_6H_5O_7Na_3$	6,8	4,3	6,3	6,5	6,5
$NaHCO_3$	6,8	4,3	—	5,0	5,3
$(COO)_2Na_2$	6,8	4,3	—	4,8	5,5
NaCl	6,3	4,0	—	3,8	3,8
NaF	6,8	4,3	—	4,5	4,5
$(NH_4)_2SO_4$	6,8	4,3	—	4,8	4,3
Tris	6,3	4,0	3,8	3,8	4,8
H_3BO_3	6,8	4,3	—	4,5	4,3
CH_3COONa	6,8	4,3	—	4,8	4,8

man jedoch mit der Ionenart auch den p_H-Wert des Elutionsmilieus, so kommt, wie der folgende in Abb. 1 und Abb. 2 dargestellte Versuch zeigt, zum Ausdruck, daß ein Teil dieser Ionen bei einem p_H-Wert, der zu einer stärkeren elektrolytischen Dissoziation dieser Verbindungen führt, ebenfalls eine eluierende Wirkung besitzt. Der p_H-Wert als solcher hat also offenbar wenig Einfluß auf die Bindung zwischen Poliovirus und Aluminiumhydroxyd, er vermittelt nur einen bestimmten Dissoziationsgrad der Anionen, bei dem sie eine eluierende Wirkung haben. Arsenat, Phosphat, Citrat und AeDTA eluieren das Poliovirus im schwach sauren Bereich oberhalb von p_H 6,0—6,5 bereits mit maximaler Wirkung, Borat und Bicarbonat erst in einem stärker alkalischen Bereich oberhalb von p_H 9,5. Eine Elution des Poliovirus durch AeDTA gelingt entsprechend den pk'-Werten seiner Dissoziation auch in weiter saurem Bereich, allerdings muß man die Konzentration der Substanz gleichzeitig erhöhen (Abb. 2). Trispuffer und Natriumchlorid haben unter den Bedingungen unserer Versuche selbst bei hohem p_H keine eluierende Wirkung.

Technik des Versuches zu Abb. 1 und 2. *Virus.* Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, 1:10 in aq. bidest. verdünnt; Adsorbens: Aluminiumhydroxyd 1%ig; Ad-

sorption: 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virus, p_H 7,0; AD: 15 min. Elution (einstufiges Verfahren): Je 5,0 ml wäßrige Lösung von Trinatriumcitrat,

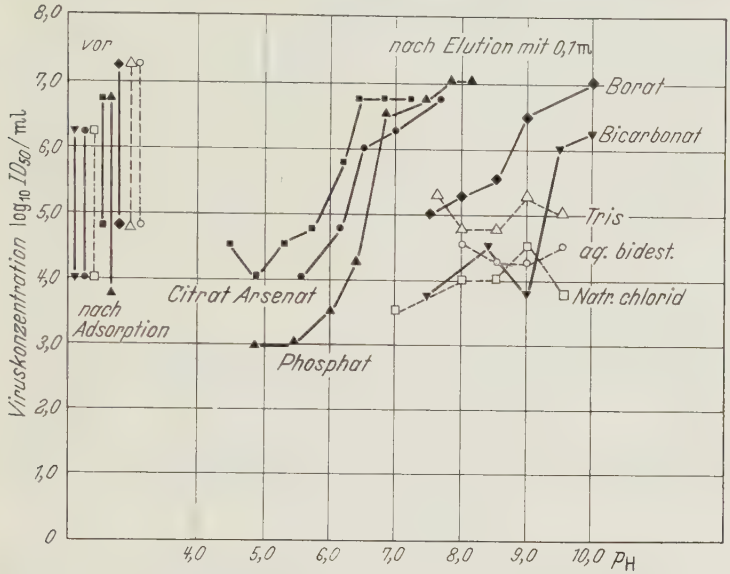


Abb. 1. Die Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, von Aluminiumhydroxyd durch 0,1 m Salzlösungen bei unterschiedlichem p_H

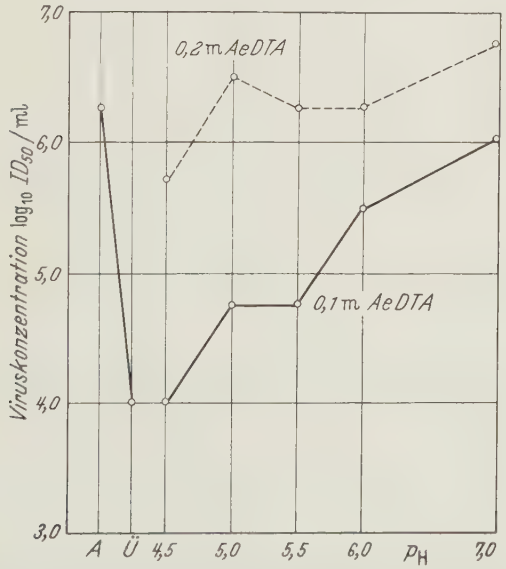


Abb. 2. Die Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, von Aluminiumhydroxyd durch AeDTA bei unterschiedlichem p_H

Dinatriumarsenat, Dinatriumhydrogenphosphat, Borsäure, Natriumbicarbonat, Natriumchlorid, AeDTA (Titriplex III), eingestellt auf verschiedene p_H-Werte mit NaOH bzw. HCl unter elektrometrischer Kontrolle. Die Messung des p_H-Wertes wurde im Elutionsmilieu vorgenommen. ED: 15 min.

Dem unterschiedlichen Verhalten der beiden Virusstämme Mahoney und LSc,2ab bei der Elution von Aluminiumhydroxyd kommt als Ausdruck spezifischer Stammeseigenschaften nun um so mehr Gewicht zu, wenn dieser Unterschied in der Elution auch bei Verwendung anderer Elutionsmittel als Phosphatlösungen in Erscheinung tritt. Aus Tab. 2 geht hervor, daß man zur Differenzierung der beiden Stämme statt Phosphat auch Citrat, Arsenat, Borsäure und Natriumbicarbonat verwenden kann. Es ist allerdings notwendig, die Untersuchungen in einem p_H-Bereich durchzuführen, in dem die genannten Ionen eine maximale Elutionsfähigkeit besitzen.

Technik des Versuches zu Tab. 2. *Virus.* Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney und Stamm LSc,2ab, 1:10 verdünnt in aq. bidest. Adsorbens: Aluminiumhydroxyd 1%ig; Adsorption: 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virus, p_H 7,0; AD: 15 min. Elution:

Tabelle 2. *Die Elution von Poliovirus Typ 1, Stämme Mahoney und LSc,2ab, von Aluminiumhydroxyd durch unterschiedliche Konzentrationen von Arsenat, Citrat Bicarbonat und Borat*

Virusstamm	Anion	p_H	Viruskonzentration* im							
			Ausgangsmaterial	Überstand	Eluat					
					0,01 m	0,05 m	0,1 m	0,2 m	0,3 m	0,4 m
Mahoney	Arsenat	7,5	6,5	4,0	7,3	6,5	7,5	6,8	—	—
LSc,2ab			6,3	4,0	4,8	5,0	5,0	4,8	4,5	6,8
Mahoney	Citrat	7,0	6,5	4,0	6,5	6,5	6,8	6,5	—	—
LSc,2ab			6,3	4,0	4,3	5,3	5,5	4,8	6,8	—
Mahoney	Bicarb.	10,0	6,5	4,0	6,3	6,0	7,0	6,8	—	—
LSc,2ab			6,3	4,0	4,0	5,5	5,5	6,0	6,3	5,8
Mahoney	Borat	9,5	6,5	4,0	4,5	6,8	6,8	—	—	—
LSc,2ab			6,3	4,0	4,0	5,0	4,5	4,0	5,3	4,5

* In $\log_{10} ID_{50}$/ml.

Je 5,0 ml einer 0,01 m, 0,05 m, 0,1 m, 0,2 m, 0,3 m und 0,4 m wäßrigen Lösung von Natriumcitrat, Dinatriumarsenat, Borsäure, Natriumbicarbonat mit NaOH bzw. HCl eingestellt auf ein p_H, bei dem ein maximales Elutionsvermögen gewährleistet ist (siehe Abb. 1). ED: 15 min.

2. Unterschiedliches Verhalten der beiden Virusstämme LSc,2ab und Mahoney bei der Elution von verschiedenen Adsorbentien (Aluminiumverbindungen, Siliciumverbindungen, Calciumphosphat).

Wenn der Unterschied im Verhalten der beiden Virusstämme bei der Elution von Aluminiumhydroxyd durch Oberflächeneigenschaften der

Viruspartikeln bedingt ist, dann muß er auch bei Verwendung anderer Adsorbentien zum Ausdruck kommen. Wir haben deshalb eine Reihe anderer Adsorbentien in dieser Hinsicht untersucht.

Technik des Versuches zu Tab. 3. *Virus.* Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney und Stamm LSc, 2ab, 1:10 verdünnt in aq. bidest. Adsorbens: Kieselgel G (Merck 7731), Aluminiumoxyd G (Merck 1090) und Calciumhydroxylapatit [$Ca_5(PO_4)_3OH$], hergestellt nach dem Verfahren von TISELIUS et al. (1956)[1], alle Substanzen 1%ig in

Tabelle 3. *Unterschiede in der Eluierbarkeit von Poliovirus, Typ 1, Stämme Mahoney und LSc, 2ab, bei der Elution von verschiedenen Adsorbentien*

Adsorbens	Virus	A	Ü	Eluate				
				0,01	0,05	0,1	0,5	0,8 m**
Kieselgel	Mahoney	6,8*	4,5	6,3	5,5	3,5	3,8	3,5
	LSc, 2ab	6,5	5,0	4,3	3,5	3,5	6,5	5,8
Aluminiumoxyd	Mahoney	6,8	5,8	6,3	5,5	3,8	3,8	3,5
	LSc, 2ab	6,5	5,5	4,5	3,5	3,5	6,5	6,0
Hydroxylapatit	Mahoney	6,5	4,3	6,0	6,3	5,5	5,0	—
	LSc, 2ab	6,8	4,0	5,0	4,8	5,0	6,8	—

* $\log_{10} ID_{50}$/ml. ** Phosphatkonzentration.

aq. bidest. bezogen auf Trockengewicht. Adsorption: 1,0 ml Adsorbens + 4,0 ml Virus, p_H 5,5. AD: 15 min. Elution (mehrstufiges Verfahren): Je 5,0 ml Phosphatpufferlösung nach SÖRENSEN p_H 7,5, 0,01 m, 0,05 m, 0,1 m, 0,5 m und 0,8 m; ED: 15 min.

Das Ergebnis dieses Versuches geht aus Tab. 3 hervor. Beide Virusstämme werden von den untersuchten Adsorbentien adsorbiert. Bei der Elution wird der gleiche Unterschied deutlich, der beim Aluminiumhydroxyd gefunden wurde: Stamm Mahoney wird bei einer viel geringeren Phosphatkonzentration eluiert als Stamm LSc, 2ab.

3. Die Stabilität des Verhaltens im Elutionstest nach Passage der Virusstämme in Gewebekulturen.

Im folgenden haben wir untersucht, ob der zwischen den beiden Virusstämmen bestehende Unterschied als Ausdruck einer echten Stammeseigenschaft auch in der Nachkommenschaft dieser Virusstämme erhalten bleibt. Wir haben die beiden Virusstämme mehrfach hintereinander in Gewebekulturen aus Affennierenzellen passiert. Das Ergebnis der mit diesen Virusmaterialien durchgeführten Elutionsversuche ist in den Abb. 3a und 3b dargestellt.

Technik des Versuches zu Abb. 3a und b. *Virusvermehrung.* Die beiden Virusstämme Mahoney und LSc, 2ab wurden in Röhrchenkulturen aus Affennierengewebe, die nach dem Trypsinaufschlußverfahren hergestellt worden waren, vermehrt. Das Virus wurde 1:10 in Lactalbuminhydrolysatlösung (0,5% LAH in Hanks-Lösung mit einem Zusatz von 0,2 mg-% Natriumbicarbonat) verdünnt und je 2 cm^3 auf die Röhrchenkulturen verimpft. Nach vollständiger Zerstörung des Zellrasens (rd.

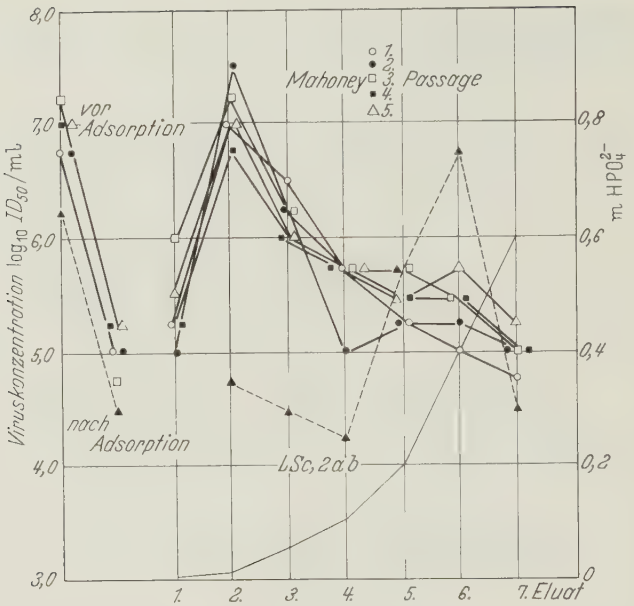


Abb. 3a. Die mehrstufige Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, von Aluminiumhydroxyd. Fünf konsekutive Passagen des Virusstammes über Affennierengewebekulturen

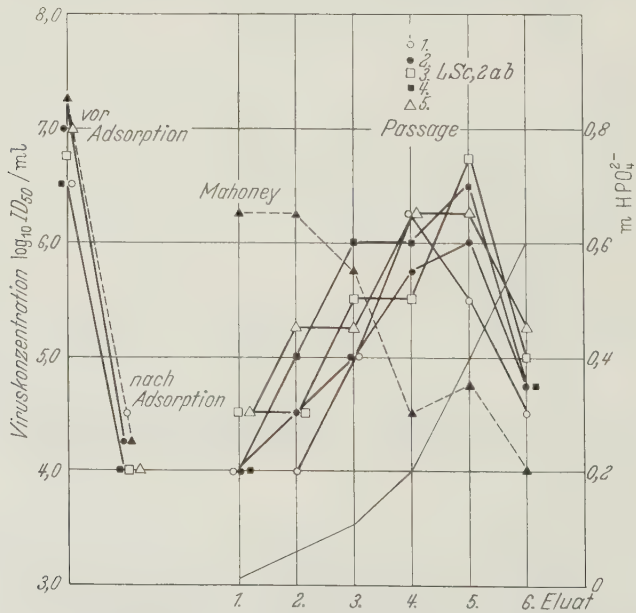


Abb. 3b. Die mehrstufige Elution von Poliovirus Typ 1, Stamm LSc, 2ab, von Aluminiumhydroxyd. Fünf konsekutive Passagen des Virusstammes über Affennierengewebekulturen

24 Std bei 37° C) wurde der Inhalt der Röhrchen einmal bei −60° C tiefgefroren, dann aufgetaut, abgezogen, der Inhalt mehrerer Röhrchen gesammelt und der Zelldetritus abzentrifugiert. Entsprechend wurde mit den weiteren Passagen verfahren.

Elutionsverfahren: Material von je 5 consec. Passagen je Virusstamm, 1:10 verdünnt in aq. bidest.; Adsorbens: Aluminin.hydr. 1%ig; Adsorption: 0,5 ml Adsorbens + 4,5 ml Virus, p_H 7,0; AD: 15 min. Elution (mehrstufiges Verfahren): Bei den Mahoneystämmen mit 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2 und 0,4 m Phosphatpuffer (Sörensen, p_H 7,5), bei den LSc, 2ab-Stämmen mit 0,01 m, 0,05 m, 0,1 m, 0,2 m, 0,4 m und 0,6 m des gleichen Puffers, p_H 7,5, jeweils 5,0 ml; ED: 15 min.

Die mehrfache Passage der beiden Virusstämme in Gewebekulturen unter den angegebenen Bedingungen hat offenbar keinen nennenswerten Einfluß auf das Verhalten bei der Elution. Die geringen Abweichungen, die die Kurven der Abb. 3a und 3b untereinander aufweisen, müssen als Streuungen angesehen werden. Das Gros der Nachkommenschaft der beiden Virusstämme verhält sich wie das Ausgangsmaterial. Danach darf man das charakteristische Verhalten der Stämme bei der Elution von Aluminiumhydroxyd und anderen Adsorbentien als ein Merkmal betrachten, welches in der Nachkommenschaft der genannten Virusstämme unter üblichen Züchtungsbedingungen in ein und demselben Gewebe nicht verlorengeht, und man darf mit Vorsicht folgern, daß es sich um einen genetisch und nicht zufallsbedingten Unterschied handelt.

4. Die Stabilität des Verhaltens von LSc, 2ab nach Passage durch den Intestinaltrakt menschlicher Impflinge.

Um die vorstehende Schlußfolgerung zu sichern und zu erweitern, haben wir die Stabilität des Verhaltens bei der Elution nach Passage von LSc, 2ab Virus durch den Intestinaltrakt menschlicher Impflinge nach oraler Impfung untersucht. Über den eigentlichen Impfversuch wurde kürzlich berichtet[2]. Wir haben insgesamt 20 Virusstämme, von denen je 2 von einem Impfling stammen, im Elutionstest, im d-Test, im rct/40-Test und MS-Test nebeneinander untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 dargestellt.

Technik der Versuche zu Tab. 4. Die Impflinge erhielten je 500000 ID_{50} LSc, 2ab. Am 5., 10. und 20. Tag nach der Impfung wurde je eine Stuhlprobe entnommen, aus der Nachkommenschaft des Impfvirus isoliert wurde. Die Impflinge waren prävaccinal tripelnegativ. Nach Abschluß der Impfung waren in allen hier mitgeteilten Fällen Antikörper gegen Typ 1 im Serum vorhanden. Angaben über die Virusisolierungstechnik können der oben genannten Veröffentlichung[2] entnommen werden. Das hier untersuchte Material stammt aus der dritten Gewebekulturpassage. Angaben über die Durchführung der Untersuchungen zur Bestimmung des rct/40-Merkmals, der Merkmale d- und MS können der II. Mitteilung der vorliegenden Untersuchungen[9] entnommen werden. Die Bewertungsgrundlagen werden am Schluß der Tab. 4 mitgeteilt. Die Elution der Virusstämme von Aluminiumhydroxyd erfolgte, um eine rasche Übersicht zu erhalten, zunächst im einstufigen Verfahren.

Aus Tab. 4 geht hervor, daß das von den Impflingen ausgeschiedene Virus in den Eigenschaften rct/40 und MS keine Unterschiede gegenüber dem verimpften Virus aufwies. Alle 20 Stämme verhielten sich MS und rct/40 negativ. In einzelnen Fällen kam es zu einer Änderung im Verhalten des Merkmales d. Einige der von den Impflingen ausgeschiedenen Virusstämme verhielten sich d+/−, andere auch d+. Das

Verhalten der ausgeschiedenen Virusstämme in bezug auf den hier in Frage stehenden Elutionstest weist demgegenüber kaum Auffälligkeiten auf. In den meisten Fällen, nämlich in 18 von 20 untersuchten Stämmen, verhielt sich das ausgeschiedene Virus im Elutionstest genauso wie der ver-

Tabelle 4. *Merkmale von Poliovirusstämmen, die aus dem Stuhl von Impflingen nach oraler Schutzimpfung mit LSc, 2ab am 5. und 20. Tag postvacc. isoliert wurden*

Impfling	Stuhl	rct/40			d			MS	B	Elutionstest			
		37° C	40° C	B	0,43	0,075	B			A	0,05m	0,1 m	0,5 m
1.	54086	>7,5*	<1,0	—	7,4**	5,2	—	3,5*	—	6,3*	—	4,8	6,8
	94480	6,8	<1,0	—	7,3	5,3	—	3,0	—	5,5	—	3,0	5,5
2.	65172	>7,5	<1,0	—	8,3	6,0	—	3,5	—	>6,5	—	4,8	>6,5
	95475	7,0	<1,0	—	7,6	5,3	—	3,0	—	6,0	—	4,0	6,0
3.	09795	7,3	<1,0	—	7,5	<5,7	—	3,5	—	>6,5	—	4,8	>6,5
	29997	7,0	<1,0	—	7,3	6,2	+/−	3,8	—	6,3	—	4,0	6,0
4.	71651	6,8	<1,0	—	7,5	6,5	+/−	3,3	—	5,8	—	4,5	6,5
	91853	>7,5	<1,0	—	7,5	6,7	+	4,0	—	6,3	—	4,8	6,0
5.	09235	7,0	<1,0	—	7,3	5,2	—	4,0	—	>6,5	—	4,3	>5,5
	29437	>7,5	1,0	—	7,3	5,0	—	4,3	—	>6,5	—	5,0	>5,5
6.	43481	7,0	<1,0	—	8,3	6,2	—	3,2	—	6,3	—	4,0	>5,5
	63683	6,8	<1,0	—	7,7	5,8	—	2,8	—	6,3	—	4,0	>5,5
7.	56785	7,0	<1,0	—	7,7	5,7	—	3,8	—	6,3	4,8	5,5	6,0
	76987	>7,5	1,5	—	7,7	6,6	+/−	3,8	—	6,5	6,3	6,3	6,3
8.	12182	7,0	1,3	—	7,8	5,8	—	3,8	—	>6,5	—	4,5	>5,5
	32383	7,3	1,0	—	7,6	6,3	+/−	4,3	—	>6,5	—	4,8	>5,5
9.	82561	7,3	<1,0	—	7,6	5,7	—	3,3	—	6,5	—	4,3	5,8
	02763	7,0	<1,0	—	7,3	6,1	+/−	3,5	—	6,0	5,5	5,8	5,8
10.	78106	7,3	<1,0	—	8,0	6,0	—	3,5	—	>6,5	—	4,0	>5,5
	98308	7,3	1,3	—	7,8	5,6	—	3,0	—	>6,5	—	4,0	>5,5
Impfvirus LSc, 2ab		7,5	<1,0	—	7,1	4,9	—	3,0	—	6,5	3,5	5,3	6,3
Mahoney		7,8	7,8	+	7,2	7,0	+	6,7	+	6,5	6,5	6,5	—

* $\log_{10}ID_{50}$/ml. ** $\log_{10}$pfu/ml. B = Bewertung.

rct/40− = log e.o.g. >4,0 d− = log e.o.p. >2,0 MS − = log e.o.g. >3,0

rct/40+/− = 2,0—4,0 d+/− = 1,0—2,0 MS +/− = 2,0—3,0

rct/+ = <2,0 d+ = <1,0 MS + = <2,0

impfte Virusstamm. Dieses Merkmal hat sich also nach Passage des Impfvirus durch das Gewebe des Intestinaltraktes verschiedener Individuen konstant erhalten und erfährt damit eine weitere Stützung als genetisch bedingte Eigenschaft dieser Virusstämme. In zwei Fällen fand sich im einfachen Elutionstest ein abweichendes Verhalten: Viren dieser beiden Proben wurden bereits bei einer niedrigeren Phosphatkonzentration eluiert, sie verhielten sich also bei der Elution wie der Stamm Mahoney.

Wir haben in diesen beiden Fällen einen mehrstufigen Elutionsversuch durchgeführt, um zu prüfen, ob es sich bei dem genannten Virusmaterial um in bezug auf das Verhalten bei der Elution homogene Virusstämme oder aber um Gemische handelt, die mit getrennten Elutionsmaxima eluiert werden können. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 5 dargestellt.

Technik des Versuches zu Tab. 5. Wir haben zunächst eine erneute Isolierung der Virusstämme aus dem Stuhlmaterial der beiden Impflinge vorgenommen und dabei auch noch weiter vorhandene, bisher aber noch

Tabelle 5. *Untersuchung von Virusmaterial, das aus dem Stuhl von zwei in Tab.4 genannten Impflingen isoliert wurde, im mehrstufigen Elutionstest*

Impfling	Stuhlprobe	A	Ü	E1 0,01 m	E2 0,05 m	E3 0,1 m	E4 0,2 m	E5 0,4 m	E6 0,6 m
St.W.	FT 56785$^{5.}$	7,3*	5,0	5,3	5,0	5,3	6,3	6,8	5,3
	FT 66886$^{10.}$	6,8	5,0	6,3	5,0	5,3	5,5	6,0	5,0
	FT 76987$^{20.}$	6,8	5,0	7,0	5,0	4,8	5,5	6,3	4,8
B.L.	FT 82561$^{5.}$	7,3	4,3	4,5	4,3	3,8	4,8	7,0	4,8
	FT 92662$^{10.}$	7,8	5,0	6,3	5,5	5,3	5,5	6,3	4,8
	FT 02763$^{20.}$	7,3	4,3	7,0	6,3	5,3	5,3	5,0	4,3
Impfvirusstamm LSc,2ab		6,5	4,5	5,3	4,5	4,3	5,8	6,8	4,5

* $\log_{10}ID_{50}$/ml.

nicht untersuchte Stuhlproben der gleichen Impflinge mit in die Untersuchung einbezogen. Die Virusisolierung wurde in Affennierengewebekulturen durchgeführt. Für den Elutionstest wurde diesmal Material der II. Gewebekulturpassage verwendet. Der Test wurde in üblicher Weise mehrstufig mit ansteigenden Phosphatkonzentrationen im Elutionsmilieu unter Verwendung von Aluminiumhydroxyd als Adsorbens durchgeführt.

Eine Analyse des in Tab. 5 dargestellten Versuchsergebnisses verdeutlicht folgendes: 1. Das aus dem jeweils ersten postvaccinalen Stuhl isolierte Virus enthält offenbar in erster Linie Virus, das sich wie das Impfvirus verhält. 2. Die aus den beiden folgenden Stuhlproben isolierten Virusstämme weichen von dem Verhalten des Impfvirus ab. Sie stellen offenbar Gemische aus Komponenten dar, die sich verschieden bei der Elution verhalten. Bei dem einen der beiden Impflinge läßt die am 20. Tag entnommene Stuhlprobe nur noch Vertreter jener Gruppe in Erscheinung treten, die sich wie Mahoney-Virus verhalten, also schon bei niedriger Phosphatkonzentration eluiert werden.

Wir haben die Nachkommenschaft der Viren aus den Endverdünnungen der Elutionsmaxima sowohl im rct/40-Test als auch erneut im Elutionstest untersucht und fanden, daß die Nachkommenschaft aller

Elutionsmaxima die Eigenschaft rct/40 — besaß, in dieser Hinsicht also nicht vom Impfvirus abwich. Die Nachkommenschaft aus den Endverdünnungen der Elutionsmaxima verhielt sich im Elutionstest nunmehr weitgehend homogen mit einer maximalen Elution entweder bei niedriger oder hoher Phosphatkonzentration (Tab. 6).

Tabelle 6. *Verhalten der Nachkommenschaft aus Endverdünnungen von FT 76987 E 1, E 5 und FT 02763 E 1 (Tab. 5) im Elutionstest und im rct/40-Test*

Virus	A	Elutionstest					rct/40-Test		
		Ü	E1 0,01	E2 0,04	E3 0,1	E4 0,4	37° C	40° C	B
FT 76987 E1	7,8*	5,5	7,8	6,5	5,3	6,3	6,5	<1,5	—
FT 76987 E5	6,8	4,8	≦4,5	4,8	4,8	6,8	6,0	<1,5	—
FT 02763 E1	7,0	5,0	7,5	7,0	5,5	5,5	7,0	<1,5	—

* $\log_{10} ID_{50}$/ml.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Virusgemische bereits im Stuhl der Impflinge vorhanden waren oder erst sekundär durch die Passage in der Gewebekultur entstanden sind, haben wir den mehrstufigen Elutionstest an Virusmaterial durchgeführt, welches direkt aus der Stuhlsuspension gewonnen wurde. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 4 dargestellt.

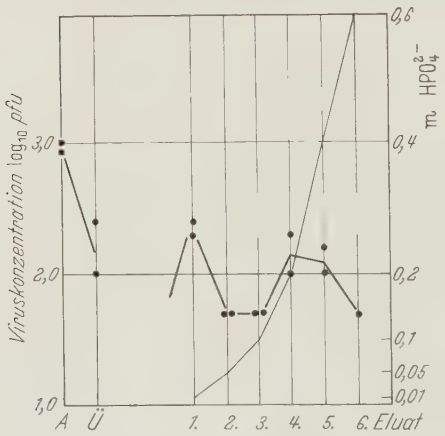


Abb. 4. Die mehrstufige Elution von Virusmaterial aus der Stuhlprobe 66886 von Aluminiumhydroxyd nach Adsorption aus der Stuhlsuspension ohne Zwischenschaltung einer Gewebekulturpassage

Technik des Versuches zu Abb. 4. Die Stuhlprobe Nr. 66886, etwa 2 g, wurde in 30 cm³ Hanks-Lösung, der Antibiotica zugesetzt waren, suspendiert und nach Zusatz von Glasperlen geschüttelt, zwischendurch zweimal eingefroren und aufgetaut. Nach Zentrifugation bei 15000 U/min in einer Kühlzentrifuge wurde der Überstand abgezogen und in den Elutionsversuch genommen. Adsorbens: Aluminiumhydroxyd 0,05%ig, Adsorption: 4,5 ml Virus + 0,5 ml Adsorbens, p_H 5,0; AD: 15 min. Elution: je 5,0 ml Phosphatpuffer nach Sörensen, p_H 7,5: 0,01 m, 0,05 m, 0,1 m, 0,2 m,,0,4 m und 0,6 m; ED: 15 min. Viruskonzentrationsbestimmung: Plaquetest auf FL-Gewebe. Beimpfungsvolumen: 0,2 ml, zwei Flaschen pro Verdünnungsstufe.

Das Verhalten des Virusmaterials, welches direkt aus dem Stuhl FT 66886 gewonnen wurde, entspricht danach im wesentlichen dem Verhalten der Nachkommenschaft dieses Virusmaterials nach drei Gewebekulturpassagen.

Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen zusammen mit den bereits publizierten Befunden[5,9,10] erlauben unseres Erachtens die Schlußfolgerung, daß es sich bei dem charakteristischen Verhalten der Virusstämme Mahoney und LSc,2ab bei der Elution von Aluminiumhydroxyd um den Ausdruck von Eigenschaften handelt, die man als genetisch determinierte Merkmale dieser Virusstämme bezeichnen kann. Der vorstehenden Schlußfolgerung liegen folgende Tatbestände zugrunde:

1. Die Anwendung unterschiedlicher Konzentrationen von sekundären Phosphationen auf die Elution von Poliovirusstämmen von Aluminiumhydroxyd gestattete die Entwicklung eines gut reproduzierbaren und hinreichend genauen Verfahrens zur Unterscheidung der beiden Poliovirusstämme des serologischen Typs 1, des Stammes Mahoney und des Stammes LSc,2ab[9].

2. Da verschiedene Milieufaktoren und Versuchsbedingungen einen Unterschied im Elutionsverhalten beider Virusstämme vortäuschen könnten, mußte gezeigt werden, daß der Unterschied bei genau gleichen Versuchsbedingungen reproduzierbar war. Es gelang, die beiden Stämme aus einem künstlichen Gemisch heraus mit einer für die Beweisführung hinreichenden Genauigkeit zu trennen[9].

3. Phosphationen können durch andere Ionen ersetzt werden, ohne daß der Unterschied im Verhalten der beiden Stämme in dem veränderten Testsystem verlorengeht. Der Unterschied tritt ebenso bei Verwendung von Adsorbentien aus anderen Stoffklassen, z. B. bei Kieselgel, Hydroxylapatit usw., in Erscheinung. In dem System: Virus-Adsorbens-Elutionsmittel können also die beiden letztgenannten Parameter geändert werden, ohne daß der Unterschied im Verhalten der beiden Virusstämme verlorengeht.

4. Das charakteristische Verhalten dieser Stämme wird auf ihre Nachkommenschaft vererbt. Es bleibt auch nach mehreren Passagen der Virusstämme in Gewebekulturen erhalten. Für den Stamm LSc,2ab konnte die Konstanz der Eigenschaft auch nach Verimpfung an menschliche Impflinge festgestellt werden. Einige Ausnahmen werden weiter unten besprochen.

Offenbar handelt es sich bei dem von Hodes u. Mitarb.[4] bei der Elution von DEAE-Cellulose und den von Robbins u. Mitarb.[9,12] bei der Elution von Aluminiumhydroxyd gefundenem Verhalten der beiden Poliovirusstämme Mahoney und LSc,2ab und den von uns beschriebenen Unterschieden um den Ausdruck bestimmter Partikelstrukturen der Viren, die in ihrer Oberfläche lokalisiert sein müssen. In den Untersuchungen der beiden genannten Autoren ist allerdings als Parameter für den Unterschied der beiden Virusstämme nicht die unterschiedliche Phosphatkonzentration verwendet worden, sondern der p_H-Wert des Elutions-

milieus. Der Vorteil der Variation der Ionenkonzentration bei der Elution liegt in zwei Dingen: 1. Diese Technik erlaubt eine präparative Trennung von Gemischen aus Virusstämmen, die sich gegenüber einem Adsorbens unterschiedlich verhalten. Es gibt bisher praktisch kein anderes intraserotypisches Merkmal von Poliovirusstämmen, auf Grund dessen eine derartige in vitro-Trennung direkt möglich ist. 2. Der zwischen zwei Virusstämmen bestehende Unterschied ist experimentell besser reproduzierbar und wird präziser definiert, da eine direkte Funktion nur zwischen der Konzentration bestimmter Anionen und dem Gleichgewicht zwischen freiem und adsorbierten Virus, nicht aber zwischen dem p_H-Wert des Elutionsmilieus und der Lage dieses Gleichgewichtes besteht. In einem p_H-Bereich um 3,0 scheint allerdings die Bindung des Poliovirus an Aluminiumhydroxyd ohnehin sehr schwach zu sein, wie May u. Shu[6] kürzlich nachwiesen.

Für die Definition eines Virusmerkmales reicht jedoch die Angabe der minimalen Anionenkonzentration mit maximalem Elutionsvermögen nicht aus, da erfahrungsgemäß eine ganze Reihe von unübersichtlichen Faktoren den Ausfall der Ergebnisse derartiger Verfahren beeinflussen kann, unter anderem Art und Menge des Adsorbens, Ionenmilieu, Viruskonzentration, p_H, Temperatur usw.[12]. Es erscheint deshalb zweckmäßig, das Verhalten eines Virusstammes bei der Elution stets auf einen Vergleichsstamm zu beziehen, so lange man über die diesem Verhalten zugrunde liegende Oberflächenstruktur der Viren keine weiteren Informationen besitzt.

Es muß an gereinigten Viruspräparaten untersucht werden, ob das unterschiedliche Verhalten der beiden Virusstämme Mahoney und LSc,2ab überhaupt Ausdruck der unterschiedlichen Festigkeit einer direkten Bindung der Viruspartikel an das Adsorbens ist oder ob Virus-Aggregate oder Virus-Zellbestandteilkomplexe eine vermittelnde Rolle dabei spielen, der beobachtete Unterschied also nur indirekter Ausdruck einer unterschiedlichen Partikelstruktur wäre.

In der vorliegenden Arbeit haben wir im Stuhl von mit Sabin LSc, 2ab-Virus geimpften Kindern Viruspopulationen nachgewiesen, die offensichtlich aus zwei Anteilen zusammengesetzt sind, einem Anteil, der sich wie das Impfvirus verhält, und einem weiteren, der sich vom Impfvirus abweichend wie der Stamm Mahoney verhält, dennoch aber die Eigenschaft rct/40 — beibehalten hat. Die von dem Verhalten des Impfvirus abweichende Komponente tritt bezeichnenderweise vor allem in Stuhlproben auf, die relativ spät nach der Impfung, am 10. und 20. Tag, entnommen wurden. Inzwischen haben wir noch weitere Impflinge untersucht und bei ihnen in einigen Fällen eine ähnlich heterogene Population der Viren besonders in den am 10. und 20. Tag entnommenen Stuhlproben gefunden. Man kann deshalb, wenn auch nicht mit absoluter Zuverlässigkeit, annehmen, daß es sich in all diesen Fällen aus Häufigkeitsgründen nicht um den Einbruch eines rct/40 negativen Wildvirus in die

postvaccinale Periode handelt, sondern um eine vom ursprünglichen Impfvirus in einer bestimmten Eigenschaft abweichende Nachkommenschaft desselben, wahrscheinlich um eine Mutante. Die Nachkommenschaft aus der Endverdünnung einer solchen früh eluierenden Komponente nach chromatographischer Trennung verhält sich homogen, also bei erneuter mehrstufiger Elution eingipflig. Unter diesem Aspekt läßt sich der vorliegende Befund folgendermaßen deuten: In den beobachteten Fällen wird zunächst eine Nachkommenschaft des Impfvirus gebildet, die mit diesem in bezug auf das Verhalten bei der Elution identisch ist. Nach einiger Zeit gewinnt eine Mutante dieses Impfvirus einen selektiven Vorteil und ist zunächst neben der unveränderten Nachkommenschaft des Impfvirus, später sogar vorwiegend vorhanden. Mithin bleibt das charakteristische Verhalten des Poliovirus LSc, 2ab bei der Elution von Aluminiumhydroxyd so lange bei der Nachkommenschaft dieses Virus erhalten, als diese eben im Intestinaltrakt menschlicher Impflinge günstige Vermehrungsbedingungen findet und nicht durch Virusstämme mit dem alternativen Verhalten in der Elution überhaupt verdrängt wird. Der Befund eines Virus mit zweigipfliger Elutionskurve im Stuhl von Kindern, die mit LSc, 2ab geimpft wurden, widerspricht demnach nicht der Auffassung von der genetischen Determinierung der Eigenschaft dieses Virusstammes, von Aluminiumhydroxyd erst bei hoher Phosphatkonzentration eluiert zu werden.

Zusammenfassung

Die vorstehenden Untersuchungen liefern eine Reihe weiterer Informationen über das Verhalten von Poliovirusstämmen des serologischen Typs 1 (Mahoney und LSc, 2ab) bei der Elution von Aluminiumhydroxyd. Der Unterschied im Verhalten beider Virusstämme als Ausdruck bestimmter Stammeseigenschaften gewinnt an Gewicht, da gezeigt werden konnte, daß der Unterschied auch bei Verwendung anderer Anionen als sekundären Phosphationen und anderen Adsorbentien in Erscheinung tritt. Das Verhalten bei der Elution scheint der Ausdruck genetisch determinierter Viruseigenschaften zu sein. Die Eigenschaft bleibt in der Nachkommenschaft der beiden Stämme aus fünf sukzessiven Passagen erhalten. Nach Passage von LSc, 2ab durch den Intestinaltrakt menschlicher Impflinge verhielt sich das ausgeschiedene Virus größtenteils wie das Impfvirus. Bei zwei von zehn Impflingen wurden im Stuhl Viruspopulationen nachgewiesen, die offenbar aus zwei Komponenten bestehen, von denen die eine sich wie Mahoneyvirus verhält, während die andere die Eigenschaft des Impfvirus beibehalten hat.

Literatur

[1] Alexander, P., and R. J. Block: In: Separation of Proteins, p. 70ff. Oxford: Pergamon Press 1960.

[2] Haas, R., V. Dostal, J. Lindenmann, G. Maass u. R. Thomssen: Virologische Untersuchungen nach oraler Poliomyelitis Schutzimpfung (Sabin). 1. Mitteilung: Untersuchungen über Virusausscheidung, Antikörperbildung und die Häufigkeit von Kontaktinfektionen. Dtsch. med. Wschr. **86**, 2413 (1961).

[3] Haas, R., R. Thomssen, G. Maass u. A. Gieseler: Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. 1. Mitteilung: Untersuchungen über die Adsorption und Elution von Polioviren unter Verwendung von Aluminiumhydroxyd als Adsorbens. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 1 (1961).

[4] Hodes, H. L., H. D. Zepp and E. Ainbender: A physical property as a virus marker. Difference in avidity of cellulose resin for virulent (Mahoney) and attenuated (LSc, 2ab) strain of type 1 poliovirus. Virology **11**, 306 (1960).

[5] Maass, G., R. Thomssen and R. Haas: The adsorption of poliovirus to aluminiumhydroxide in relation to genetic markers. 7. Symposium der Association Europeene contre la Poliomyelite. Oxford, 17th—20th Sept. 1961. Verhandlungsberichte.

[6] May, G., u. H. L. Shu: Die Adsorption und Elution von Poliovirus mit $Al(OH)_3$. Arch. ges. Virusforsch. **11**, 284 (1961).

[7] Moore, St., and W. H. Stein: Column chromatography of peptides and proteins. Advanc. Protein Chem. **11**, 191 (1956).

[8] Robbins, Fr. C.: Diskussionsbemerkung in Live Poliovirus Vaccines. Papers presented at the second intern. conf. on live poliovirus vaccines, p. 45 (1960).

[9] Thomssen, R., G. Maass u. R. Haas: Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. 2. Mitteilung: Unterschiedliches Verhalten verschiedener Poliovirusstämme (Wildstämme und abgeschwächte Stämme) bei der Elution von Aluminiumhydroxyd. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 14 (1961).

[10] Thomssen, R., G. Maass u. R. Haas: The adsorption of polioviruses to aluminium hydroxide: A method of differentiation between strains of the same serological type. 7. Symposium der Association Europeene contre la Poliomyelite. Oxford, 17th—20th September, 1961. Verhandlungsberichte.

[11] Woods, W. A., and Fr. C. Robbins: The elution properties of type 1 polioviruses from $Al(OH)_3$ gel, A possible genetic marker. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **47**, 1501 (1961).

[12] Zittle, Ch.: Adsorption studies of enzymes and other proteins. Advanc. Enzymol. **14**, 319 (1953).

Dr. Reiner Thomssen und Dr. Günter Maass,
Hygiene-Institut der Universität, 78 Freiburg i. Br., Hermann Herder-Straße 11

Zeitschrift f. Hygiene 148, 491—500 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. R. Haas)

Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren*

IV. Mitteilung

Die intratypische Differenzierung von ECHO-9 Virusstämmen durch Elution von Aluminiumhydroxyd

Von
G. Maass und R. Thomssen

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. März 1962)

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden[7], daß die Poliovirusstämme Mahoney und LSc,2ab nach ihrer Adsorption an Aluminiumhydroxyd unterschiedlich eluiert werden. Im neutralen bis schwach alkalischen p_H-Bereich wird der Stamm Mahoney bereits durch eine 0,01 m Phosphatlösung quantitativ eluiert. Dagegen tritt die Elution des Stammes LSc,2ab erst durch eine mindestens 40fach höhere Phosphatkonzentration ein. Dieses verschiedene Verhalten der beiden Virusstämme ist offenbar Ausdruck einer genetisch determinierten unterschiedlichen Oberflächenstruktur der Viruspartikel, da es nach Passagen der Stämme in vivo und/oder in vitro als konstantes Merkmal der Virusstämme nachgewiesen werden kann.

Nach diesen Befunden ist es naheliegend, innerhalb anderer Enterovirustypen nach gleichartigen Unterschieden bei der Elution verschiedener Stämme zu suchen und der Frage eines möglichen Zusammenhanges dieser Eigenschaften mit anderen Merkmalen der Virusstämme nachzugehen. Wir berichten im folgenden über das Adsorptions- und Elutionsverhalten gegenüber Aluminiumhydroxyd bei mehreren Stämmen des ECHO-Virus Typ 9. Dieser ECHO-Typ wurde ausgewählt, da es nach den Befunden von Eggers u. Sabin[1] möglich erscheint, daß die unterschiedliche Pathogenität der einzelnen Stämme dieses Typs für saugende Mäuse — zumindest bei einigen Stämmen — Ausdruck einer unterschiedlichen Oberflächenstruktur der Viruspartikel ist. Ein Teil der von uns untersuchten Stämme ist pathogen für saugende Mäuse, ein anderer Teil dagegen nicht.

* Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Material und Methoden

Die allgemeine Versuchsanordnung wurde in früheren Veröffentlichungen eingehend beschrieben[2,7].

Virusstämme. Die untersuchten Virusstämme einschließlich ihrer Pathogenität für saugende Mäuse sind in der Tabelle aufgeführt.

Die Stämme DNN, CCT, MR und NN wurden als nicht mäusepathogene ECHO-9 Stämme von Dr. Melnick* (Houston, Texas) übersandt. Den Stamm Hill, der ursprünglich von Ramos-Alvarez u. Sabin[4] isoliert worden war, erhielten wir von Dr. Krech* (Bern), ebenfalls den Stamm TN 200. Die übrigen Stämme wurden in den Jahren 1956—1958 im hiesigen Institut aus Untersuchungsmaterial von Erkrankten isoliert.

Tabelle. *Bezeichnung und Angabe über Pathogenität für saugende Mäuse der untersuchten ECHO-9 Stämme*

Stamm	Pathogenität für saugende Mäuse	
	Inocul. $TCID_{50}$/Maus	Lähmungsrate
V4A (Infekt. GWK-überstand)	$10^{1,8}$	4/8
(Homogenat saug. Mäuse)	$10^{1,3}$	11/11
Vg 252/58	$10^{4,6}$	8/8
Vg 105/58	$10^{3,6}$	8/8
TN 200	$10^{3,8}$	5/10
Hill	$10^{5,6}$	0/7
DNN	$10^{6,1}$	0/8
NN	$10^{5,8}$	0/7
CCT	$10^{5,8}$	0/8
MR	$10^{5,8}$	0/5

Alle Stämme waren im hiesigen Institut mehrfach in Affennieren-Gewebekulturen passiert worden. Für die Versuche diente bei allen Stämmen infektiöser Gewebekulturüberstand der 3.—5. Passage, beim Stamm V4A außerdem ein Organhomogenat infizierter saugender Mäuse. Dieses Homogenat wurde durch Herstellung einer 20%igen Suspension der Muskulatur infizierter saugender Mäuse in Hanks durch Zerkleinern im Ultra-Turrax (Fa. Jahnke und Kunkel) gewonnen.

Adsorbens. Als Adsorbens verwendeten wir für alle Versuche Aluminiumhydroxyd C γ nach Wilstätter u. Kraut[8] (Behringwerke, Marburg/L.), das in 100 ml eine 1 bzw. 2 g Al_2O_3 entsprechende Menge $Al(OH)_3$ enthält.

Adsorption und Elution. Adsorption und Elution wurden nach zwei verschiedenen Verfahren vorgenommen. Bei dem einen Vorgehen, das wir als einstufige oder simultane Elution bezeichnen, erhalten eine Anzahl Röhrchen gleiche Volumenverhältnisse Adsorbens und Virussuspension. Nach einer bestimmten Adsorptionszeit wird das Sediment abgeschleudert, der Überstand dekantiert, das Adsorbat einmal in aqua bidest. gewaschen und anschließend in jedem Röhrchen die Elution gleichzeitig durch die verschieden konzentrierten Elutionsmittel (Phosphatpuffer nach Sörensen) vorgenommen. Unter einer sukzessiven oder mehrstufigen Elution verstehen wir dagegen ein Verfahren, bei dem Virus und Adsorbens lediglich in einem Röhrchen zusammen gegeben werden und nach entsprechendem Zentrifugieren, Dekantieren des Überstandes und Waschen des Sedimentes die Elution nacheinander mit den verschieden konzentrierten Elutionsmitteln erfolgt. Alle Untersuchungen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Virustitration. Die Konzentrationsbestimmungen der Viren erfolgten in Röhrchenkulturen trypsin-aufgeschlossener Affennieren-Gewebekulturen. Es wurden Verdünnungsstufen in $\log_{10}$ Stufen in einer 0,5% Lactalbuminhydrolysatlösung

* Herrn Dr. J. L. Melnick (Houston, Texas) und Herrn Dr. U. Krech (z. Zt. Bern) danken wir für die Überlassung der Virusstämme.

(Nutritional Biochemical Corp., Cleveland, Ohio) in Hanks hergestellt; pro Verdünnungsstufe wurden vier Röhrchen mit jeweils 1,0 ml beimpft. Die Berechnung der Virustiter erfolgte nach Reed u. Muench[5], die Angaben werden in $TCID_{50}$/1,0 ml gemacht.

Prüfung der Pathogenität für saugende Mäuse. Die unverdünnten infektiösen Gewebekulturüberstände und/oder $\log_{10}$ Verdünnungsstufen wurden auf je einen Wurf saugender Mäuse (24—48 Std alt) verimpft. Die Inoculation erfolgte subcutan unter die Nackenhaut, Inoculationsvolumen ca. 0,02 ml/Maus. Als Krankheitszeichen werteten wir typische Extremitätenparesen der Tiere.

Durchführung des rct-Testes. Die Vermehrungsfähigkeit der Stämme bei verschiedenen Bebrütungstemperaturen wurde durch Anfertigung von vier parallelen Titrationen (siehe oben) jedes zu prüfenden Virusstammes untersucht. Die Bebrütung der Röhrchen erfolgte dann entweder bei 37, 38, 39 oder 40° C. Die Bebrütung bei 38, 39 und 40° C erfolgte in Wasserbädern, wobei die Röhrchen vollständig in das Wasser eingetaucht wurden, die Bebrütung bei 37° C dagegen im Brutraum. Die Ablesung der Röhrchen erfolgte am 6. Tag nach Beimpfung.

Ergebnisse

In einem ersten Versuch wurde die Elution verschiedener ECHO-9 Stämme von Aluminiumhydroxyd durch Phosphationen in unterschiedlicher Konzentration geprüft.

Technik. 4,5 ml Virus (1:10 in aqua bidest. verdünnt) + 0,5 ml Adsorbens; Adsorptionsdauer (AD) 10 min. Simultane Elution [Elutionsdauer (ED) 10 min] durch jeweils 5,0 ml Phosphatpuffer (p_H 7,4) folgender Konzentrationen: 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 bzw. 0,01; 0,1 und 0,5 m.

Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 1 zusammengefaßt. Die Stämme TN 200, V4A, Vg 105/58, Vg 252/58 und der Stamm MR werden bereits durch eine 0,005 bzw. 0,01 m Phosphatlösung quantitativ eluiert. Dagegen tritt die Elution der Stämme Hill, DNN, CCT und NN erst durch eine 0,5 m Phosphatlösung ein. Eine gesetzmäßige Korrelation des Elutionstyps mit der Pathogenität der Stämme für saugende Mäuse läßt sich also nicht beobachten, wenn auch die meisten nicht-mäusepathogenen Stämme erst durch eine vergleichsweise höher konzentrierte Phosphatlösung eluiert werden.

Hieraus ergibt sich die Frage, ob diese unterschiedliche Elution der ECHO-9 Stämme Ausdruck einer unterschiedlichen Virusoberflächenstruktur ist oder ob im einzelnen nicht übersehbare Milieufaktoren diesen Unterschied bedingen. Um diese Frage beantworten zu können, haben wir eine Trennung von zwei ECHO-9 Stämmen, die zu ihrer Elution verschiedene Phosphatkonzentrationen benötigen, aus einem Gemisch dieser beiden Stämme versucht. Hierzu wurden die Stämme Hill und V4A gemischt, die Mischung an Aluminiumhydroxyd adsorbiert und durch sukzessive Elution wieder in die einzelnen Stämme getrennt. Unter gleichen Bedingungen wurden die Stämme V4A und Hill allein adsorbiert und eluiert.

Technik. 4,5 ml Virus + 0,5 ml Adsorbens. Hierzu wurde der Stamm V4A 1:100 in aqua bidest. verdünnt, der Stamm Hill 1:10; außerdem

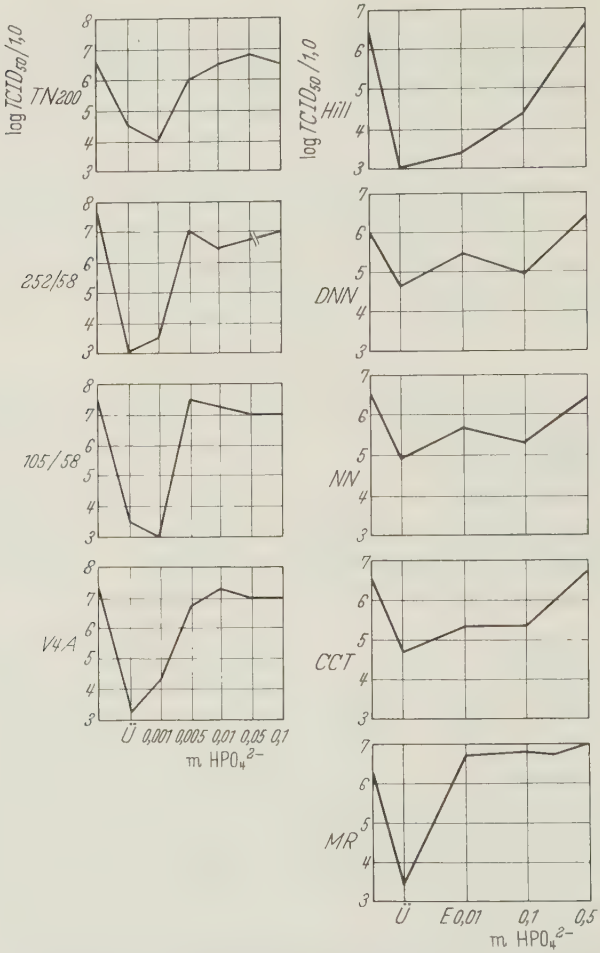


Abb. 1. Simultane Elution verschiedener ECHO-9 Stämme von $Al(OH)_3$ durch Phosphatpuffer (Sörensen) unterschiedlicher Konzentration. Links sind die mäusepathogenen, rechts die nicht-mäusepathogenen Stämme aufgetragen. *Ü* Überstand

wurde ein Gemisch aus gleichen Teilen dieser Virussuspensionen untersucht. AD 10 min. Sukzessive Elution (ED 10 min) mit jeweils 4,5 ml folgender Phosphatpuffer (p_H 7,2): 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 und 0,8 m.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist aus Abb. 2 zu ersehen. Das an Aluminiumhydroxyd adsorbierte Gemisch der beiden Stämme wird in zwei Maxima eluiert, eines liegt bei 0,005 m, das zweite bei 0,2 m. Die

Elutionsmaxima zeigen eine Übereinstimmung mit den Elutionen der beiden einzelnen Komponenten des Gemisches, den Stämmen V4A und Hill. Nach diesem Befund scheiden Milieufaktoren als ursächliches

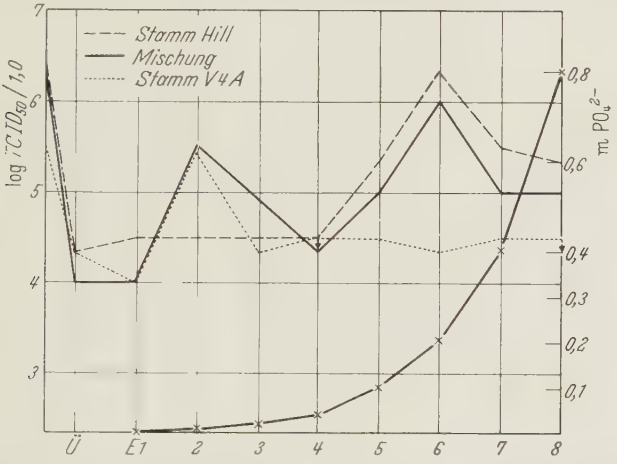


Abb. 2. Sukzessive Elution der ECHO-9 Stämme V4A, Hill und eines Gemisches dieser beiden Stämme durch Phosphatpuffer steigender Konzentration. *Ü* Überstand; *E* Eluat

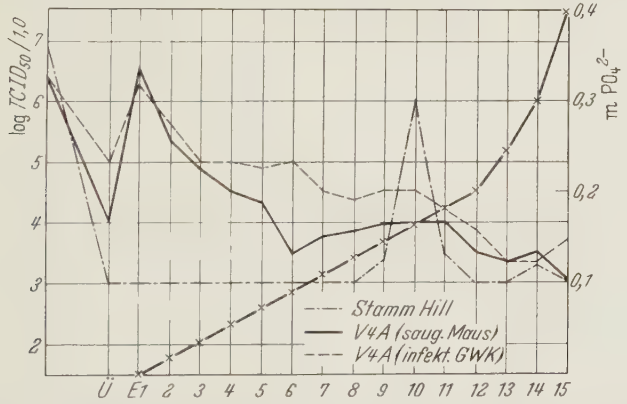


Abb. 3. Sukzessive Elution der ECHO-9 Stämme V4A und Hill durch Phosphatpuffer steigender Konzentration. Der Stamm V4A wurde als infektiöser Gewebekulturüberstand und als Homogenat infizierter saugender Mäuse an $Al(OH)_3$ adsorbiert

Moment für die unterschiedliche Elution der beiden Virusstämme aus, da das Reaktionsmilieu für die beiden einzelnen Komponenten des Gemisches ja gleich ist, so daß die verschiedene Elution als Ausdruck einer unterschiedlichen Oberflächenstruktur der Viren der beiden Stämme angesehen werden kann.

Zur Sicherung dieses Befundes haben wir außerdem den Stamm V4A einmal als infektiösen Gewebekulturüberstand und zum anderen aus

einem Organhomogenat infizierter saugender Mäuse an $Al(OH)_3$ adsorbiert und in üblicher Weise wieder eluiert. Als Kontrolle wurde unter gleichen Bedingungen der Stamm Hill untersucht.

Technik. 4,5 ml Virus (als infektiöser Gewebekulturüberstand 1:10 und als infektiöses Organhomogenat 1:100 in aqua bidest. verdünnt) + 0,5 ml Adsorbens; AD 15 min. Sukzessive Elution (ED 15 min) mit Phosphatpuffern folgender Konzentration (p_H 7,0) 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,12; 0,14; 0,18; 0,2; 0,25; 0,30 und 0,40 m.

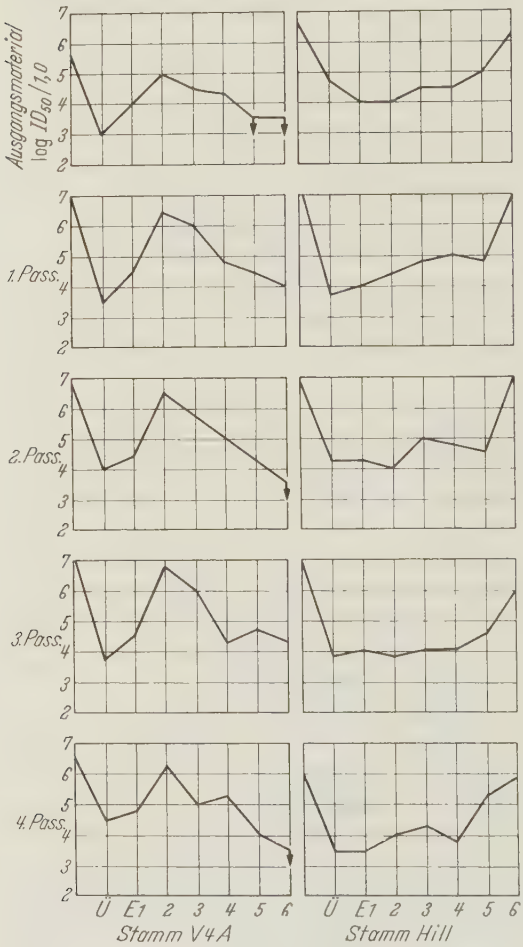


Abb. 4. Sukzessive Elution von vier konsekutiven Passagen der ECHO-9 Stämme V4A und Hill durch Phosphatpuffer steigender Konzentration

Die Ergebnisse sind aus Abb. 3 ersichtlich. Die Elution des Stammes V4A verläuft bei den beiden untersuchten Virussuspensionen gleichsinnig, so daß es offenbar gleichgültig ist, aus welchem Milieu die Adsorption der Viren an das Aluminiumhydroxyd erfolgte. Die Elution erfolgt praktisch vollständig bei den entsprechenden Molaritäten, eine zweite Komponente tritt weder bei der Elution des Stammes V4A noch bei der des Stammes Hill auf.

Die zwei Elutionstypen verschiedener ECHO-9 Stämme können somit als Analogon zu dem Verhalten der beiden Polio Typ 1 Stämme Mahoney und LSc, 2ab angesehen werden. Um den Befund zu sichern, daß es sich hierbei um eine konstante Eigenschaft der Virusstämme handelt, haben wir die Elution von zwei Virusstämmen über mehrere Passagen der Viren in der Gewebekultur verfolgt.

Technik. Das Ausgangsmaterial der Stämme V4A und Hill wurde viermal fortlaufend in Affennieren-Gewebekulturen passiert. Hierzu

wurde nach Beimpfung und vollständiger Zerstörung des Zellrasens der Gewebekulturüberstand zusammen mit dem Zelldetritus einmal eingefroren (— 20° C) und wieder aufgetaut und der Zelldetritus abzentrifugiert. Die so gewonnene Virussuspension wurde erneut auf eine Vierkantflasche verimpft, nach einer Inkubationszeit von 60 min mit 0,5% Lactalbuminhydrolysatlösung in Hanks überschichtet usw. Die auf diese Weise gewonnenen fünf Proben jedes Stammes wurden dann nach folgendem Vorgehen adsorbiert und eluiert: 4,5 ml Virus (1:10 in aqua bidest.

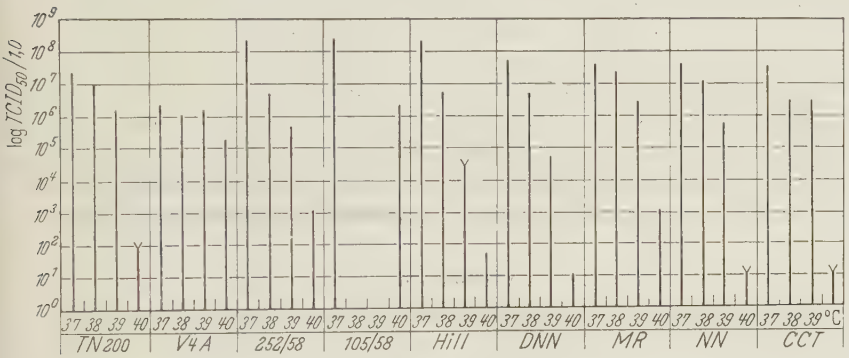


Abb. 5. Virustiter verschiedener ECHO-9 Stämme bei Bebrütungstemperaturen von 37° C, 38° C, 39° C und 40° C

verdünnt) + 0,5 ml Adsorbens; AD 10 min. Sukzessive Elution (ED 10 min) mit Phosphatpuffern (p_H 7,2) folgender Konzentration: 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 und 0,5 m.

Die Ergebnisse sind aus Abb. 4 zu ersehen. Sowohl der Stamm Hill wie der Stamm V4A zeigen in allen Passagen den gleichen Elutionstyp. Geringe Abweichungen vom Verlauf des Ausgangsmaterials können als Ausdruck einer versuchstechnisch bedingten Streuung angesehen werden.

Die unterschiedliche Elution der ECHO-9 Stämme haben wir außer mit ihrer Pathogenität für saugende Mäuse mit dem Merkmal rct der Viren verglichen. Hierunter verstehen wir die Vermehrungsfähigkeit von Virusstämmen unter verschiedenen Bebrütungstemperaturen[6].

Technik. Siehe unter Methoden.

Die Ergebnisse sind aus Abb. 5 zu ersehen. Eine Inkubationstemperatur von 40° C führt zu einer deutlichen Einschränkung der Vermehrungsfähigkeit der Stämme DNN, CCT, NN und Hill (gemessen am Vergleich der Virustiter einer gegebenen Virussuspension bei einer Bebrütung von 37° C und 40° C). Bei diesen Stämmen beträgt die Titerdifferenz zwischen dem Virustiter bei 37° C und bei 40° C mehr als 6 $\log_{10}$-Stufen. Auch bei der Prüfung dieser Eigenschaft rct/40 unterscheidet sich der Stamm MR von den übrigen nicht-mäusepathogenen Stämmen. Bei ihm beträgt die entsprechende Titerdifferenz nur 4,5 $\log_{10}$.

Die untersuchten mäusepathogenen Stämme zeigen bei Prüfung ihrer Eigenschaft rct/40 ein sehr unterschiedliches Verhalten. Während bei den Stämmen TN 200 und Vg 252/58 eine Titersenkung um mehr als 5,0 $\log_{10}$-Stufen gegenüber dem Virustiter bei 37° C eintritt, beträgt sie bei dem Stamm V4A nur 1 $\log_{10}$-Stufe.

Die bei einer Inkubationstemperatur von 39° C beobachtete Titersenkung der untersuchten Stämme verläuft nicht stets mit der bei 40° C festgestellten Einschränkung der Vermehrungsfähigkeit parallel. Es sei hier z. B. auf das unterschiedliche Verhalten der Stämme DNN und CCT verwiesen. Das gleiche gilt ebenfalls für die nach einer Bebrütungstemperatur von 38° C gemessene Vermehrungsfähigkeit der Stämme.

Aus diesen Beobachtungen kann man wohl den Schluß ziehen, daß es für jeden ECHO-9 Virusstamm eine bestimmte, charakteristische Abhängigkeit der Vermehrungsfähigkeit von der Inkubationstemperatur gibt, die jedoch offenbar in keinem gesetzmäßigen Zusammenhang mit den beiden anderen untersuchten Eigenschaften der Virusstämme steht.

Diskussion

Die untersuchten ECHO-9 Stämme werden nach ihrer Adsorption an Aluminiumhydroxyd unterschiedlich eluiert. Bei einigen Stämmen tritt die Elution — im neutralen bis schwach alkalischen p_H-Bereich — bereits durch eine 0,01 m Phosphatlösung vollständig ein, bei anderen dagegen erst durch eine mindestens 0,2 m Phosphatlösung. Diese verschiedene Elution der Viren muß als Ausdruck einer unterschiedlichen Oberflächenstruktur der Viruspartikel angesehen werden, die offenbar genetisch bedingt ist. Diese Aussage stützt sich auf folgende Befunde. Die charakteristische, verschiedenartige Elution von zwei Stämmen (Stämme Hill und V4A) blieb auch nach vier konsekutiven in vitro Passagen der Viren unverändert bestehen. Zufällige, im einzelnen nicht übersehbare Milieufaktoren konnten als ursächliches Moment der unterschiedlichen Elution ebenfalls ausgeschlossen werden. Zwei Stämme, die zu ihrer Elution von Aluminiumhydroxyd verschiedene Phosphatkonzentrationen benötigen, wurden gemischt und diese Mischung nach ihrer Adsorption an Aluminiumhydroxyd durch sukzessive Elution wieder getrennt. Für die Elution ist es ferner gleichgültig, ob die Adsorption der Viren aus einem infektiösen Gewebekulturüberstand oder aus einem Organhomogenat infizierter saugender Mäuse erfolgte; die Elution verlief in beiden Fällen gleichsinnig.

Hiernach erscheint die Aussage berechtigt, daß die Elution der ECHO-9 Virusstämme von einem anorganischen Adsorbens ein genetisch fixiertes Merkmal der Virusstämme ist, das zur Charakterisierung der jeweiligen Stämme herangezogen werden kann. Versucht man eine Korrelation dieser unterschiedlichen Elution der ECHO-9 Stämme von Aluminium-

hydroxyd mit ihrer Pathogenität für saugende Mäuse aufzustellen, so fällt natürlich auf, daß alle mäusepathogenen Stämme bereits durch eine vergleichsweise geringe Phosphatkonzentration eluiert werden, während die Mehrzahl der nicht-mäusepathogenen Stämme erst durch eine mindestens 20fach höhere Phosphatkonzentration eluiert wird. Der nicht-mäusepathogene Stamm MR ist in dieser Hinsicht eine Ausnahme, bei ihm genügt bereits eine geringe Phosphatkonzentration zur Elution.

Es findet sich bei der Untersuchung der ECHO-9 Stämme also ein gleichartiges Verhalten, wie wir es bei attenuierten und Wildstämmen des Poliovirus Typ 1 gefunden haben[7]. Die fehlende Pathogenität verschiedener Virusstämme für bestimmte Tierspecies — saugende Mäuse bei den ECHO-9 Viren bzw. Rhesusaffen bei den Polioviren — muß sich nicht notwendigerweise durch ein gleichartiges Verhalten bei der Elution von einem anorganischen Adsorbens ausprägen. Möglicherweise findet diese Beobachtung ihre Erklärung, wenn man berücksichtigt, daß die Mäusepathogenität der ECHO-9 Viren eine sehr komplexe Eigenschaft ist, die durch verschiedene Faktoren bedingt wird. Nach den Untersuchungen von Eggers u. Sabin[1] fehlt die Mäusepathogenität einer Reihe von ECHO-9 Stämmen — z.B. dem Stamm Hill —, da die Viruspartikeln nach ihrer Inoculation in saugende Mäuse nicht adsorbiert werden. Andere, nicht-mäusepathogene Stämme werden dagegen adsorbiert, ihre Vermehrungsrate ist aber so gering, daß die Virus-bedingte Zellzerstörung innerhalb der für die Viren dieses Typs empfänglichen Lebensperiode der Maus nicht ausreicht, um zu einer faßbaren Funktionsstörung bei den inoculierten Tieren zu führen.

In einer weiteren Untersuchung verglichen wir die ECHO-9 Stämme, die zu ihrer Elution von Aluminiumhydroxyd verschiedene Phosphatkonzentrationen benötigen, mit ihrer Eigenschaft rct, der Vermehrungsfähigkeit von Virusstämmen bei unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen[6]. Es wurden jeweils vier parallele Titrationen der verschiedenen Virusstämme bei 37, 38, 39 und 40°C inkubiert. Die bei diesen Temperaturen ermittelten Viruskonzentrationen einer gegebenen Virussuspension zeigten — in ähnlicher Weise, wie es für Poliovirus Typ 1 nachgewiesen wurde[3] — eine für jeden Virusstamm charakteristische Abhängigkeit der Vermehrungsfähigkeit von den verschiedenen Bebrütungstemperaturen. Diese unterschiedliche Vermehrungsfähigkeit bei verschiedenen Bebrütungstemperaturen ist jedoch nicht mit der charakteristischen Elution dieser Stämme von Aluminiumhydroxyd korreliert. Es zeigt sich auch keine Korrelation dieser Eigenschaft rct mit der Mäusepathogenität der Stämme. Bei den nicht-mäusepathogenen Stämmen DNN und CCT beträgt die Differenz zwischen dem Virustiter bei 37°C und bei 40°C 5—6 $\log_{10}$-Stufen; der gleiche Titerunterschied besteht auch bei den mäusepathogenen Stämmen TN 200 und Vg 252/58. Bei dem ebenfalls

mäusepathogenen Stamm V4A beträgt dieser Titerunterschied nur eine $\log_{10}$-Stufe.

Nach diesen Befunden muß das Verhalten eines ECHO-9 Stammes bei der Elution von Aluminiumhydroxyd als ein Merkmal dieses Stammes angesehen werden, das weder mit seiner Virulenz (Mäusepathogenität) noch mit seinem rct-marker in einem direkten Zusammenhang steht. Auch die beiden zuletzt erwähnten Eigenschaften von ECHO-9 Stämmen zeigen keine Korrelation.

Zusammenfassung

Es wurde die Elution verschiedener ECHO-9 Stämme nach ihrer Adsorption an Aluminiumhydroxyd untersucht. Einige Stämme wurden bereits durch eine niedrige Phosphatkonzentration quantitativ eluiert, bei anderen tritt die Elution dagegen erst durch eine mehr als 20fach höhere Phosphatkonzentration ein. Diese verschiedene Elution ist Ausdruck einer offenbar genetisch determinierten unterschiedlichen Oberflächenstruktur der Viruspartikeln. Ein gesetzmäßiger Zusammenhang dieser unterschiedlichen Elution mit der Pathogenität der Stämme für saugende Mäuse oder auch mit ihrer Vermehrungsfähigkeit bei verschiedenen Inkubationstemperaturen (rct-marker) ließ sich nicht feststellen.

Literatur

[1] Eggers, H. J., and A. B. Sabin: Factors determining pathogenicity of variants of ECHO 9 virus for newborn mice. J. exp. Med. **110**, 951 (1959).

[2] Haas, R., R. Thomssen, G. Maass u. A. Gieseler: Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. I. Untersuchungen über die Adsorption und Elution von Polioviren unter Verwendung von Aluminiumhydroxyd als Adsorbens. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 2 (1961).

[3] Lwoff, A., et M. Lwoff: Les événements cycliques du cycle viral. I. Effets de la température. Ann. Inst. Pasteur **101**, 469 (1961).

[4] Ramos-Alvarez, M., and A. B. Sabin: Characteristics of poliomyelitis and other enteric viruses recovered in tissue culture from healthy American children. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **87**, 655 (1954).

[5] Reed, L. J., and H. W. Muench: A simple method of estimating fifty per cent end point. Amer. J. Hyg. **27**, 43 (1938).

[6] Sabin, A. B.: Reproductive capacity of polioviruses of diverse origions at various temperatures. The Gustav Stern Symposium on Perspectives in Virology II, New York (N.Y.), 26. 1. 1960.

[7] Thomssen, R., G. Maass u. R. Haas: Über die Verwendung von Aluminumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. II. Unterschiedliches Verhalten verschiedener Poliovirusstämme (Wildstämme und abgeschwächte Stämme) bei der Elution von Aluminiumhydroxyd. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 14 (1961).

[8] Willstätter, R., u. H. Kraut: Zur Kenntnis der Tonerdehydrate. 1. Mitteilung. Ber. dtsch. chem. Ges. **56**, 149 (1923). 2. Mitteilung. Ber. dtsch. chem. Ges. **57**, 58 (1924).

Dr. G. Maass und Dr. R. Thomssen,
Hygiene-Institut der Universität, 78 Freiburg i. Br., Hermann Herder-Straße 11

Zeitschrift f. Hygiene 148, 501–506 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. R. Haas)

Schwärmhemmung von Proteus durch hypotone und hypertone Nährmedien

Von
R. Kopp

(Eingegangen am 10. April 1962)

Naylor beschreibt einen einfachen Rinderextrakt-Pepton-Agar, der das Schwärmen von Proteus hemmt, ohne sein Wachstum oder das anderer Bakterien, die in der kulturellen Diagnostik eine Rolle spielen, zu beeinflussen. Finegold u. Sweeney stellen fest, daß Proteus mirabilis- und Proteus vulgaris-Stämme, die auf normalen Blut-Agar-Platten in üblicher Weise schwärmen, auf einfachem BBL-Nähragar (nach BBL-Products-Manual, 4th Ed. 1956: Pepton 5,0 g, Rinderextrakt 3,0 g, Agar 15,0 g, Aqua dest. ad 1 l; p_H 6,8) dies Phänomen vermissen lassen. Daß es bei Proteus auf salzarmen Nährböden zu einem Verlust des H-Antigens kommt, hatte 1929 schon Olitzki festgestellt.

Die Schwärmhemmung beruht nach Naylor auf dem Fehlen von NaCl in dem verwendeten Nährboden. Ein Zusatz von 0,5% NaCl, wie er in den meisten Nährmedien enthalten ist, hebt die Schwärmhemmung auf. Die Frage, auf welche Weise das Fehlen von NaCl im Nährmedium das Schwärmen von Proteus zu verhindern vermag, stellt Naylor nicht. Sie ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an 21 Stämmen von Proteus mirabilis durchgeführt. Es handelte sich um frische Wildstämme, von denen 14 aus Urin, 4 aus Eiter, 2 aus Galle und 1 aus Sputum isoliert worden waren. Als Basisnährmedien wurde verwendet:

„Difco"-Agar	2,0 g
Fleischpepton „Merck"	1,0 g
Wasser	ad 1000 ml
p_H 6,8 ±	

Der Nähragar wurde im Dampftopf sterilisiert und in üblicher Weise in Platten gegossen. Die Platten wurden 60 min bei +37°C getrocknet. Diesem Basisagar wurden in den einzelnen Versuchsreihen Zusätze zugefügt. Die Stämme wurden in der Regel von Blutagarplatten auf die verschiedenen verwendeten Versuchsplatten überimpft und bei +37°C bebrütet. Wenn nicht anders angegeben, wurde nach 18 Std abgelesen und dabei geprüft, ob Schwärmen zu beobachten war oder nicht. Die Angaben „mmol/l" bezeichnen die realen osmotischen Konzentrationen der dem Basismedium zugefügten Zusätze.

Versuch 1. Die Stämme wurden auf einen Nährboden gebracht, der aus dem beschriebenen Basisagar und einem Zusatz von 200 mmol/l KBr (= 1,29%), Dulcit (= 3,58%), Mannit (= 3,58%) oder Lactose (= 6,69%) bestand. Außerdem wurden alle Stämme auf normale Blutagarplatten (Basisagar + 0,5% NaCl + 5% difibriniertes Hammelblut) und auf NaCl-freien Nähragar überimpft.

Versuch 2. Dem Basisagar wurden um jeweils 20 mmol/l ansteigende Konzentrationen von NaCl bzw. Dulcit zugesetzt (20—140 mmol/l). Der Agar wurde in die Platten pipettiert, so daß gleiche Schichtdicke aller Platten gewährleistet war. Es wurden für diese Versuche neue, gleichmäßig dicht schließende Platten verwendet, um den Einfluß der bei verschieden gut schließenden Platten schwankenden Feuchtigkeit des Nährmediums auf die Schwärmfähigkeit der Stämme auszuschalten. Jeder Agar wurde durch einen „Graben" halbiert, so daß in jede Platte zwei Stämme eingebracht werden konnten. Beide Impfstriche wurden senkrecht zum „Graben" auf gleiche Höhe in die Peripherie der Platte gesetzt. Überimpft wurde aus einer Fleischwasser-Bouillon mit einer feinen Öse. Dadurch war es möglich, immer annähernd gleiche Mengen aufzutragen. Die Stämme schwärmten von den Impfstrichen aus in Richtung des „Grabens". Jeder Stamm wurde auf alle NaCl- und Dulcit-Platten gebracht, einschließlich Kontrolle (Basisagar ohne Zusatz), also jeder Stamm auf 15 Platten. Die Abstände der äußeren Ränder der peripheren Schwärmringe von den Impfstrichen wurden auf den NaCl- und Dulcit-Platten nach 15 Std gemessen und in den verschiedenen Konzentrationsbereichen miteinander verglichen.

Versuch 3. Dem Basisagar wurden ansteigende Konzentrationen von NaCl (500 mmol/l = 1,59%, 700 mmol/l = 2,24%, 900 mmol/l = 2,90%, 1100 mmol/l = 3,54%, 1200 mmol/l = 3,86% und 1300 mmol/l = 4,19%) zugesetzt. Die Stämme wurden auf diese sechs Platten gebracht und bei +37°C bebrütet. Nach 12 Std wurden die Abstände des äußeren Randes der peripheren Schwärmringe vom Impfstrich gemessen.

Versuch 4. Die Stämme wurden auf Nährmedien gebracht, die außer dem Basisagar 1200 mmol/l NaCl (= 3,86%), KBr (= 8,06%) oder Dulcit (= 20,9%) enthielten. Als Kontrolle dienten normale Blutagarplatten.

Ergebnis

Zunächst konnte in einem Vorversuch unter Verwendung des beschriebenen Nähragars bei 21 Proteus mirabilis-Wildstämmen der Befund Naylors bestätigt werden. Nur in einem Falle war angedeutetes Schwärmen zu beobachten. Die anderen 20 Stämme schwärmten nicht. Größe und Aussehen der Kolonien glichen denen anderer Enterobacteriaceen wie E. coli. Nach Zusatz von 0,5% NaCl zu dem Basisagar schwärmten die geprüften Stämme genauso profus wie auf den üblichen Blutplatten, die als Kontrolle mitliefen und dieselbe Menge NaCl enthielten.

In Versuch 1 schwärmten alle Stämme auf allen Platten, und zwar auf allen Platten etwa gleich stark und auch etwa gleich stark wie auf den normalen Blutplatten, die als erste Kontrolle mitliefen. Auf NaCl-freien Agarplatten (zweite Kontrolle) wuchsen die Stämme als Einzelkolonien und schwärmten nicht, von der schon erwähnten einen Ausnahme abgesehen.

Versuch 2 ergab folgendes: Der Abstand zwischen Impfstrich und äußerem Rand des peripheren Schwärmringes vergrößerte sich mit an-

steigenden Konzentrationen von NaCl und Dulcit, d.h. die Schwärmfähigkeit wurde mit ansteigender Konzentration größer. Diese Zunahme der Schwärmfähigkeit verlief auf beiden Plattenarten, NaCl- und Dulcit-Platten, ganz parallel. Als Beispiele seien von den untersuchten Stämmen zwei herausgegriffen (Tab. 1).

Tabelle 1

NaCl	Dulcit		
Reale osmotische Konzentration von NaCl in mmol/l	Abstand des äußeren Randes des peripheren Schwärmringes vom Impfstrich		Reale osmotische Konzentration von Dulcit in mmol/l
Stamm 8306 H			
0	gut angegangen, schwärmt nicht,		0
20 = 0,06%	beginnendes Schwärmen		20 = 0,36%
40 = 0,12%	3 mm	3 mm	40 = 0,72%
60 = 0,18%	9 mm	10 mm	60 = 1,08%
80 = 0,24%	(—)	15 mm	80 = 1,44%
100 = 0,31%	26 mm	22 mm	100 = 1,80%
120 = 0,37%	42 mm	34 mm	120 = 2,16%
140 = 0,43%	58 mm	38 mm	140 = 2,53%
Stamm 8342 H			
0	gut angegangen, schwärmt nicht,		0
20 = 0,06%	2 mm beginnendes Schwärmen		20 = 0,36%
40 = 0,12%	13 mm	14 mm	40 = 0,72%
60 = 0,18%	16 mm	21 mm	60 = 1,08%
80 = 0,24%	(—)	32 mm	80 = 1,44%
100 = 0,31%	36 mm	46 mm	100 = 1,80%
120 = 0,37%	50 mm	47 mm	120 = 2,16%
140 = 0,43%	mehr als 60 mm		140 = 2,53%

Von den untersuchten Stämmen begannen 10 schon bei Zusatz von 20 mmol/l osmotischer Konzentration zu schwärmen, 1 bei 40 mmol/l, 6 bei 60 mmol/l und 2 bei 80 mmol/l. Der schon erwähnte eine Stamm zeigte auch schon auf dem zusatzfreien Basisagar beginnendes Schwärmen.

Versuch 3 zeigte, daß mit NaCl-Konzentrationen von über 500 bis 700 mmol/l im Nährmedium die Schwärmfähigkeit von Proteus mehr und mehr nachläßt. Durch Zusätze von 1200 mmol/l wuchsen auch sehr stark schwärmende Stämme nur als distinkte Kolonien ohne Schwärmhof. Als Beispiele seien von den untersuchten Stämmen drei herausgegriffen. Tab. 2 zeigt das Schwärmverhalten der drei Stämme zwischen 0 und 1300 mmol/l.

Versuch 4 ließ erkennen, daß auch durch Zusatz anderer Stoffe in genügend hohen Konzentrationen (1200 mmol/l) das Schwärmen von

Tabelle 2

Reale osmotische Konzentration von NaCl in mmol/l	Abstand des äußeren Randes des peripheren Schwärmringes vom Impfstrich		
	Stamm 8283 H	Stamm 8287 H	Stamm 8414 H
0	schwärmt nicht	schwärmt nicht	schwärmt nicht
20	10 mm	10 mm	1 mm
40	25 mm	12 mm	2 mm
60	28 mm	14 mm	5 mm
100	42 mm	24 mm	30 mm
120	↑	48 mm	36 mm
140	|	↑	↑
↑	| schwärmt	| schwärmt	| schwärmt
	| profus	| profus	| profus
	| über ganze	| über ganze	| über ganze
↓	| Platte	| Platte	| Platte
700	↓	20 mm	↓
900	14 mm	2 mm	13 mm
1100	4 mm	begin. Schwärm.	begin. Schwärm.
1200	begin. Schwärm.	schwärmt nicht	schwärmt nicht
1300	schwärmt nicht	schwärmt nicht	schwärmt nicht

Proteus in gleicher Weise gehemmt werden kann wie durch NaCl. Die untersuchten Stämme verhielten sich bei Zusatz von 1200 mmol/l KBr, Dulcit und Mannit wie bei der entsprechenden Konzentration des Versuches 3.

Diskussion

Naylors Befund ließ zwei Deutungen zu. Erste Deutung: Voraussetzung für das Schwärmen von Proteus ist die Anwesenheit von Elektrolyten im Nährboden in bestimmter Konzentration. Wird diese Konzentration unterschritten, so wird das Schwärmen gehemmt. Naylors Arbeit ließ daran denken, daß die Anwesenheit ganz bestimmter Elektrolyte, etwa von Na-Ionen oder anderer Alkali-Ionen oder Cl-Ionen oder anderer Halogen-Ionen, notwendig sein könnte. Zweite Deutung: Voraussetzung für das Schwärmen von Proteus ist ein bestimmter osmotischer Druck des Nährmediums. Wird dieser osmotische Druck unterschritten, so wird das Schwärmen gehemmt. War diese zweite Deutung zutreffend, so hätte Naylor durch Zusatz von 0.5% NaCl nur einen bestimmten notwendigen osmotischen Druck des Nährmediums eingestellt, und der gleiche Effekt mußte auch durch Zusatz entsprechender Mengen anderer Stoffe, auch Nichtelektrolyte, etwa Zucker oder ähnlicher organischer Verbindungen, zu erzielen sein.

Welche dieser beiden möglichen Deutungen der Naylorschen Befunde richtig war, sollte geklärt werden. Versuch 1 ließ zunächst erkennen, daß das Schwärmen von Proteus nicht an die Anwesenheit von Na- oder Cl-Ionen geknüpft ist. Proteus schwärmte auch auf einem KBr-Nährboden.

Den gleichen Befund hat Schneierson erhoben, der NaCl im Nähragar durch eine Reihe anderer Salze ersetzte und zu dem Schluß kam, daß „der Zusatz von NaCl oder einem andern Salz zum Medium letztlich für das Schwärmen von Proteus verantwortlich ist".

Ob tatsächlich die Anwesenheit von Elektrolyten im Medium notwendig ist oder ob nicht vielmehr, worauf schon das Ergebnis des Versuches mit dem KBr-Nährmedium hindeutete, die Schwärmfähigkeit von einem bestimmten osmotischen Druck des Mediums abhängt, mußten weitere Versuche klären. Es wurden jetzt dem Basisagar statt Salze bestimmte organische Stoffe, nämlich zwei Hexite und ein Disaccharid, zugesetzt, welchen gemeinsam war, daß sie für den Stoffwechsel von Proteus inert sind, insoweit sich das aus dem Nichtauftreten saurer Stoffwechselprodukte bei ihrer Inkubation mit Proteus-Stämmen in flüssigen oder festen Medien schließen läßt.

Proteus schwärmte auf allen Medien. Daraus mußte geschlossen werden, daß die zweite Deutung des Naylorschen Befundes richtig ist: Voraussetzung für das Schwärmen von Proteus ist ein bestimmter osmotischer Druck des Nährmediums. Dieser Befund wurde durch Versuch 2 weiter gestützt. Zusätze gleicher osmotischer Konzentrationen von NaCl und Dulcit zum Nährmedium haben den gleichen Effekt auf die Schwärmfähigkeit von Proteus (Tab. 1). Bei den meisten Stämmen löst schon eine geringe Erhöhung des osmotischen Drucks das Schwärmphänomen aus. Unsere diesbezüglichen Befunde stimmen mit denen von Schneierson überein, der bei den von ihm untersuchten zehn Proteus-Stämmen festgestellt hat, daß die minimale NaCl-Konzentration im Nährmedium, die das Schwärmen auslöst, zwischen 0,05 und 0,15% liegt.

Durch Versuchsreihen, wie sie Tab. 1 zeigt, sollte es möglich sein, die verschieden starke Schwärmfähigkeit verschiedener Proteus-Stämme in etwa quantitativ zu bestimmen.

Wenn hypotone Nährmedien das Schwärmen von Proteus hemmten, wie die Versuche 1 und 2 gezeigt haben, so lag es nahe, zu prüfen, ob auch hypertone Medien einen Effekt auf die Schwärmfähigkeit haben. Versuch 3 zeigte, daß auch hypertone Medien das Schwärmen von Proteus hemmen. Schon Braun u. Sckäffer haben darauf hingewiesen, daß ein Zusatz von 3% Kochsalz zu gewöhnlichem Nähragar das Schwärmen von Proteus OX 19 unterbindet und vermutet, daß es sich dabei um einen osmotischen Effekt handelt.

Der Wert dieses Befundes liegt in Folgendem:

1. Er ist ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des osmotischen Drucks des Nährmediums für die Schwärmfähigkeit von Proteus.

2. Er ist für die praktische kulturelle Diagnostik von Interesse.

Naylor schlägt das NaCl-freie Nährmedium für die Diagnostik vor in Fällen, wo Untersuchungsmaterial schwärmende Proteusstämme

enthält. Von Belang kann nun in solchen Fällen der Nachweis hämolysierender Streptokokken neben Proteus sein, deren Hämolysephänomene bei Verwendung hypotoner Medien als differentialdiagnostisches Kriterium nicht mit herangezogen werden können. In hypertonem Medium bei 1200 mmol/l dagegen sind die Erythrocyten stabil, und man kann auf solchen ebenfalls schwärmhemmenden Blut-Agar-Platten die β-Hämolyse erkennen. 40 Stämme von Streptococcus pyogenes, die von Rachenabstrichen oder aus Eiter isoliert waren, zeigten auf der einen Zusatz von 1200 mmol/l NaCl enthaltenden Blutagarplatte β-Hämolyse. Bei 26 dieser Stämme war der Hämolysehof etwa gleich groß und etwa gleich intensiv wie auf einer normalen Blutagarplatte. Bei den restlichen 14 der untersuchten Stämme war die Koloniengröße gegenüber der auf einer normalen Blutagarplatte etwas reduziert. Sie ließen bei gleicher Intensität der Hämolyse einen entsprechend kleineren Hämolysehof erkennen.

Daß es für die Schwärmhemmung gleichgültig ist, durch welche Elektrolyte oder organischen Stoffe man den osmotischen Druck des Nährmediums erhöht, zeigt der Versuch 4.

Zusammenfassung

Die von Naylor beobachtete Schwärmhemmung von Proteus auf NaCl-freien Medien ist ein osmotisches Phänomen. Hypotone (Zusätze unter 140 mmol/l) und hypertone (Zusätze über 500 mmol/l) Nährmedien hemmen das Schwärmen von Proteus. In dem dazwischenliegenden Bereich (Zusätze zwischen 140—700 [—900] mmol/l) schwärmt Proteus profus. Bei Zusätzen unter 20 mmol/l und über 1100—1200 mmol/l ist das Schwärmen der meisten Stämme vollständig gehemmt. Auf die Möglichkeit des Nachweises hämolysierender Streptokokken neben Proteus auf hypertonem (1200 mmol/l) Blutagar wird hingewiesen.

Literatur

Braun, H., u. H. Schäffer: Zur Biologie der Fleckfieberproteusbazillen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **89**, 339 (1919).

Finegold, S. M., and E. E. Sweeney: New selective and differential medium for the coagulase-positive staphylococci allowing rapid growth and strain differentiation. J. Bact. **81**, 636 (1961).

Naylor, P. G. D.: A simple medium which controls the swarming of proteus. J. med. Lab. Technol. **17**, 3 (1960).

Olitzki, L.: Über den Einfluß von Wasserstoffionenkonzentration und Salzgehalt des Nährbodens auf das serologische und kulturelle Verhalten einiger Bakterienarten der Typhus-Paratyphus-, Proteus- und Dysenterie-Gruppe. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. **113** 395 (1920).

Schneierson, S. S.: Production of discrete, nonswarming colonies by proteus on medium deficient in sodium chloride and other salts. J. Bact. **82**, 621 (1961).

Dr. Rudolf Kopp,
Hygiene-Institut der Universität, 78 Freiburg i. Br., Hermann Herder-Straße 11

Zeitschrift f. Hygiene 148, 507—511 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster/Westf.
(Direktor: Prof. Dr. H. Reploh)

Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung von Paromomycin

Von
W. Ritzerfeld

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. Mai 1962)

Das Breitspektrum-Antibioticum Paromomycin befindet sich neuerdings auch in Europa im Handel, nachdem 1959/60 erste Erprobungen seiner Wirksamkeit in den USA durchgeführt worden waren. Die Substanz — gewonnen aus Streptomyces rimosus forma paromomycinus (D-glucosamin-desoxy-streptamin-D-ribose-diamino-hexose) — wurde uns zu Prüfzwecken von der Herstellerfirma überlassen. Über die bei den Untersuchungen erzielten Ergebnisse soll im folgenden berichtet werden.

Nach amerikanischen Angaben schützt das Antibioticum Mäuse vor Infektionen durch Staphylokokken, Klebsiellen, Salmonellen, Shigellen, Pseudomonas-, Proteus- und Colikeimen (Coffey u. Mitarb.). Eine tuberkulostatische und vor allem auch eine amöbizide Wirkung soll gleichfalls vorhanden sein (Fisher u. Mitarb.; Bell u. Mitarb.; Courtney u. Mitarb.). Über gute Effekte auf Trichomonaden berichteten kürzlich Bret u. Mitarb. Kreuzresistenz der Substanz besteht mit Streptomycin, Neomycin und Streptothricin. Staphylokokken entwickeln in vitro eine Resistenz, die jedoch in wirkstofffreiem Milieu wieder zurückgeht. Nach einer Mitteilung der Herstellerfirma wurden sämtliche Staphylokokkenstämme, die gegen Tetracyclin, Chloramphenicol und Erythromycin resistent waren, sowie INH-, PAS- oder streptomycin-resistente Tuberkelbakterien von der Substanz beeinflußt.

Klinisch lieferte Paromomycin gute Resultate bei Enteritiden durch verschiedene gram-negative Stäbchen. Nach Untersuchungsergebnissen von Muth (1961) war die Substanz jedoch bei Paratyphus-Infektionen wirkungslos, während er und Mössner (1962) bei anderen Salmonella-Infektionen zum Teil gute Resultate erzielten. Günstig wurden Lebensmittelvergiftungen — hervorgerufen durch verschiedene Erreger — beeinflußt. Da die Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes die Substanz nicht resorbiert, sind in diesem Gebiet hohe Wirkstoffspiegel zu erreichen; allgemeine Infektionen eignen sich weniger für eine Therapie mit Paromomycin. Die Verträglichkeit soll gut sein. Über Superinfektionen mit Staphylokokken wurde bis jetzt nicht berichtet, so daß Muth zu der Forderung kommt: „Staphylokokken-Enteritiden sind sofort mit Humatin[1] zu behandeln". Auch Mössner betont in seinem Bericht über Behandlungsergebnisse an 95 Patienten die Bedeutung dieser Substanz für die Bekämpfung der Staphylokokken-Enterocolitis. Allerdings wurden vom letzteren Autor relativ häufig Nebenwirkungen (breiige Stuhlentleerungen, Durchfälle) beobachtet. Gleichzeitig wird auf die Möglichkeit des

[1] Eingetragenes Warenzeichen für Paromomycin.

Überhandnehmens von Sproßpilzen bei älteren Patienten und Säuglingen hingewiesen. Bret u. Mitarb. schlagen deshalb vor, bei Behandlung der vaginalen Trichomoniasis parallel mit Paromomycin auch ein Antimycoticum zu geben.

Für die eigenen Untersuchungen kamen Stanzlochtest, Röhrchenverdünnungstest und Atemmessung in Anwendung. Die geprüften pathogenen Mikroorganismen waren dem täglichen Untersuchungsmaterial der Varia-Abteilung entnommen worden.

Mittels des *Stanzlochtestes* (Vergleichsstamm Staph. aur. SG 511), der einen Überblick über die allgemeine Resistenzlage und orientierende Unterlagen für weitere Prüfungen liefern sollte, wurden die in Tab. 1 aufgeführten Resultate gewonnen.

Tabelle 1

Keimart	Gesamtzahl der Stämme	Empfindlichkeitsgrad der Keime		
		gut	mäßig	keine
Staph. aur. haem.	409	225	83	1
Enterokokken	164	9	69	86
vergrünende Streptokokken	69	7	42	20
hämolysierende Streptokokken	28	6	15	7
Bact. coli	455	194	229	32
Bact. proteus	166	77	71	18
Pseudomonaskeime	186	60	60	66
Aerobacter aerog.	48	17	24	7

In der Tabelle sind die Resistenzergebnisse von insgesamt 1525 Bakterienstämmen angeführt. Staphylokokken zeigten die höchste Empfindlichkeit. Auch Bact. coli und Bact. proteus wurden größtenteils gut oder mäßig beeinflußt. Bei den Pseudomonasstämmen verteilten sich die Empfindlichkeitsgrade gleichmäßig auf alle drei Stufen. Aerobacter aerogenes zeigte unter den gram-negativen Stäbchen die höchste Resistenz. Auffallend war die geringe Wirksamkeit der Substanz auf Streptokokken. Selbst die Testung an neun Pneumokokkenstämmen (in der Tabelle nicht aufgeführt) ergab keine günstigeren Resultate. Dagegen wurden sämtliche zusätzlich geprüften 36 Staph. albus-Stämme vom Paromomycin gut gehemmt, ebenso ein einzelner Salmonella-Stamm. Drei Hefestämme, die in einer ersten orientierenden Untersuchung getestet worden waren, zeigten unter Paromomycin-Einfluß unverändert gutes Wachstum. Diese Ergebnisse des Stanzlochtestes bestätigen insgesamt die Angaben aus der amerikanischen Literatur, wenn dort zum Teil die Wirkung auch noch besser angegeben wird. Bemerkenswert für die Therapie von Enteritiden ist die gute Beeinflussung der Staphylokokkenstämme. Auch nach diesen in vitro Ergebnissen wird die Substanz bei Staphylokokken-Enterocolitiden (Enterotoxinbildner!) gute Therapieergebnisse erwarten lassen.

Im *Röhrchen-Verdünnungstest* wurden 50 Stämme geprüft; die Ergebnisse zeigt Tab. 2:

Tabelle 2

Keimart	Gesamtzahl der Stämme	Hemmkonzentration in γ/ml						
		>10	10	8	6	4	2	0,25
Staph. aur. haem.	12				2	2	6	2
Enterokokken	5	3	1	1				
vergrünende Streptokokken	2				1		1	
hämolys. Streptokokken	1					1		
Bact. coli	15	1	5	3	4	2		
Bact. proteus	7	1	3	1	2			
Pseudomonaskeime	6	2	1		2	1		
Salmonella infantis	1		1					

Für Staphylokokken genügten relativ geringe Dosierungen zur Erzielung eines Hemmeffektes. Gram-negative Stäbchen und Enterokokken wurden erst durch höhere Konzentrationen beeinflußt. Da die Substanz nicht resorbiert wird und im Verdauungstrakt entsprechend hohe Konzentrationen erwartet werden können, wird eine Beeinflussung auch dieser Keime in vivo oft möglich sein.

Die *Warburg-Versuche* wurden unter Verwendung von zwei verschieden empfindlichen Staphylokokken-Stämmen, einem Coli-Stamm und

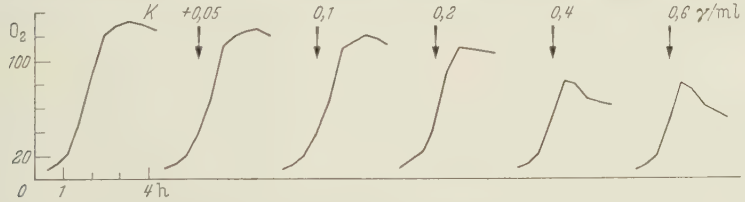


Abb. 1. Atemkurven des Staph. SG 511 mit steigenden Paromomycin-Dosen

einem Salmonella-Stamm mit der üblichen Methodik durchgeführt. Die Hemmwerte im Röhrchentest für die Staphylokokken betrugen 0,25 γ/ml (SG 511) bzw. 2 γ/ml (Stamm 8368), für die beiden gram-negativen Stäbchen je 10 γ/ml Substanz. Abgestufte Wirkstoffkonzentrationen wurden der Bakterienaufschwemmung während der log. Phase zugegeben.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Atemmessungen. Der Staphylokokkenstamm SG 511 (Abb. 1) wurde nicht durch die geringen Konzentrationen 0,05 und 0,1 γ/ml beeinflußt. Erste deutliche Wirkung trat bei Zugabe von 0,2 γ/ml auf. Dieser Befund überraschte, da nach unseren bisherigen Erfahrungen im Warburg-Versuch geringere Dosierungen als im Röhrchentest benötigt werden, um Hemmeffekte hervorzurufen.

Die Dosierungen von 0,4 und 0,6 γ/ml Substanz ließen deutlich bakteriostatisch geprägte Atemkurven entstehen.

Der höher resistente Staphylokokkenstamm 8368 (Abb. 2) wies auch im Atemversuch erhöhte Resistenzwerte auf.

Eindeutige Wirkungen wurden erst mit der Konzentration 2 γ/ml beobachtet, also mit der zehnfachen Menge, die für erste Veränderungen der SG 511-Kurve ausgereicht hatte. Die Ergebnisse von Röhrchen- und Atemtest stimmten wiederum überein, d.h. gleiche Hemmdosen wurden für beide Testmethoden benötigt. Bactericide Wirkung fand sich bei 5 γ/ml Substanz.

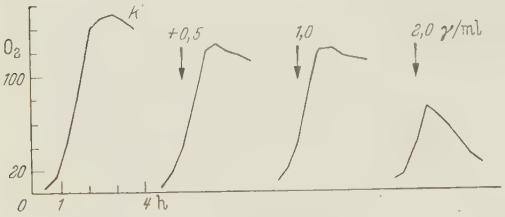


Abb. 2. Atemkurven des Staph.-Stammes 8368 mit steigenden Paromomycin-Dosen

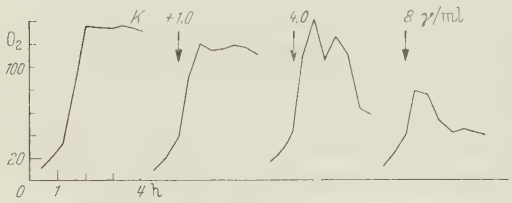


Abb. 3. Atemkurven eines Coli-Stammes mit steigenden Paromomycin-Dosen

Die gram-negativen Stäbchen wurden erst durch höhere Wirkstoffkonzentrationen gehemmt. Bact. coli wurde durch 4 γ/ml Substanz deutlich beeinflußt und zeigte bei der Verdoppelung der Menge auf 8 γ/ml starken Atemabfall (Abb. 3). Eindeutige Bactericidie wurde jedoch erst mit 40 γ/ml erreicht — festgestellt durch Subkultur.

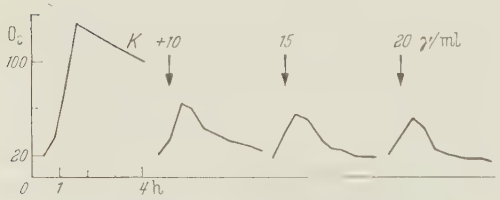


Abb. 4. Atemkurven eines Salmonella-Stammes mit steigenden Paromomycin-Dosen

Die Befunde an Salmonella infantis (im Röhrchentest gleiche Empfindlichkeit wie Bact. coli) ergänzen die Ergebnisse der Coli-Prüfung. Hier wurden höhere Konzentrationen gegeben (10, 15 und 20 γ/ml), und entsprechend waren die Veränderungen der Kurven stärker ausgebildet (Abb. 4).

Die Atmung des Salmonella-Stammes fiel mit allen drei Konzentrationen in der Beobachtungszeit bis auf geringe Werte ab.

Wesentliche Unterschiede in der Ausbildungsform der Kurven bei den verschiedenen Konzentrationen bestanden nicht. Es ist zu diskutieren, ob nach längerer Einwirkungszeit und bei zeitlich weiter ausgedehnter Beobachtung ein neuer Anstieg erfolgt wäre oder ob die Dosierung für

degenerative bzw. bactericide Effekte genügt hätte. Anschließend durchgeführte Kontrollsubkulturen sprachen für die bactericiden Eigenschaften der Substanz — unter Verwendung hoher Dosierungen (kein Wachstum bei 20 γ/ml).

Die einzelnen Testmethoden ergaben nach vorliegenden Ergebnissen deutliche Wirkungen bei Staphylokokken und bei einem bedeutenden Teil der gram-negativen Stäbchen. Streptokokken wurden dagegen relativ geringgradig beeinflußt. Die guten Effekte der Substanz auf die Darmkeime und auf die pathogenen Staphylokokkenstämme, die bei hoher Dosierung bis in den bactericiden Bereich hineingehen, lassen eine wirksame Beeinflussung von Darmerkrankungen als durchaus möglich erscheinen. Sie bestätigen damit die günstigen Resultate, über die in letzter Zeit aus der Klinik berichtet worden ist.

Zusammenfassung

Das Breitspektrum-Antibioticum Paromomycin wurde auf seine antibakterielle Wirkung mittels Stanzlochtest, Röhrchentest und Atemmessung geprüft. Über 1525 Bakterienstämme (Staphylokokken, Streptokokken und gram-negative Stäbchen) wurden untersucht. Es zeigte sich, daß die Staphylokokken und ein großer Teil der gram-negativen Stäbchen — vor allem Coli- und Proteusbakterien — gut zu beeinflussen waren. Mit der Atemmessung konnte die Wirkungsweise genauer differenziert und analysiert werden. In hoher Dosierung kann die Substanz nach vorliegenden Ergebnissen offenbar degenerativ bzw. bactericid wirken.

Literatur

Bell, S., and A. W. Woodruff: Humatin in intestinal Amebiasis. Amer. J. trop. Medicine Hyg. **9**, 155 (1960).

Bret, A. J., et S. Simon: L'action antitrichomonasique de la Paromomycine. Presse méd. **70**, 127 (1962).

Coffey, G. I., L. Anderson, M. W. Fisher, M. M. Galbraith, A. B. Hillegas, D. O. Kohlberger, P. E. Thompson, K. S. Weston and J. Ehrlich: Biological Studies of Paromomycin. Antibiot. and Chemother. **9**, 730 (1959).

Courtney, K. O., P. E. Thompson, R. Hodgkonson and J. R. Fitzsimmons: Paromomycin as a Therapeutic Substance for Intestinal Amebiasis and Bacterial Enteritis. Antibiot. Ann. **1959–1960**, 304.

Fisher, M. W., M. C. Manning, L. A. Galiardi, M. R. Gaetz and A. L. Erlandson: Paromomycin: Experimental Antibacterial Activity. Antibiot. Ann. **1959–1960**, 293.

Mössner, G.: Paromomycin, ein neues Antibiotikum zur Behandlung von Darminfekten. Dtsch. med. Wschr. **87**, 185 (1962).

Muth, H. W.: Behandlung bakterieller intestinaler Erkrankungen mit Humatin (Paromomycin). Ther. d. Gegenw. **7**, 362 (1961).

Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Ritzerfeld,
Hygiene-Institut der Universität, 44 Münster/Westf., Westring 10

Zeitschrift f. Hygiene 148, 512—516 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. W. Brauss)

Untersuchungen über die Spezifität des gewebsimmunogenen Faktors schleimhautpathogener Enterobacteriaceen

Von
Wolfgang Stenzel

(Eingegangen am 13. Juni 1962)

Untersuchungen über die Immunitätsverhältnisse am Meerschweinchenauge nach abgelaufener Shigella-Keratoconjunctivitis haben gezeigt, daß sich im Gefolge der Infektion eine auf das betreffende Auge beschränkte, mehr oder weniger stark ausgebildete Gewebsimmunität entwickelt, die nicht nur gegen den homologen Stamm, sondern auch gegen andere Serotypen der Shigella-Gruppe gerichtet ist[2,5,9]. Daß dieser Immunität trotzdem eine gewisse Spezifität zukommt, wurde von Gekker et al.[1] am Beispiel einer fortbestehenden Empfänglichkeit für Infektionen mit C. diphtheriae und von Szturm-Rubinstein u. Piéchaud[9] durch erfolgreiche Zweitinfektion mit L. monocytogenes bewiesen.

Die Shigellen besitzen also einen gemeinsamen immunogenen Faktor, der nicht mit ihren Lipopolysacchariden identisch sein kann, dagegen möglicherweise Beziehungen zum eigentlichen pathogenetischen Prinzip dieser Keime aufweist.

Die Befähigung, im Tierversuch Keratoconjunctivitis auszulösen, kommt in erster Linie allen echten Shigellen zu. Es ist jedoch auch ein enteropathogener E. coli-Serotyp — 0124: K 72 (B17) — bekannt, der am Meerschweinchenauge ein in nichts von der Shigellose zu unterscheidendes Krankheitsbild verursacht[6]. Wir fanden weiterhin einen S. enteritidis-Stamm, welcher nicht nur — wie von einzelnen Salmonella-Stämmen bekannt[1,3,4,6,7] — eine Conjunctivitis des Meerschweinchenauges auslöste, sondern auch mit einiger Regelmäßigkeit flüchtige Keratitis verursachte.

Es ist bislang noch ungeklärt, inwieweit sich das Gewebsimmunitäts-System der Shigellen auch auf augenpathogene Stämme aus der E. coli- und Salmonella-Gruppe erstreckt. Von besonderem Interesse ist hier die Frage nach den Immunitätsbeziehungen zwischen Shigellen und E. coli 0124, da Shigella- und E. coli-Gruppen genotypisch und phänotypisch aufs engste miteinander verflochten sind[8].

Wir haben deshalb die gewebsimmunologischen Beziehungen zwischen einem Sh. flexneri 2-, einem Sh. sonnei-, einem Sh. scholtensii[8]-, einem E. coli 0124-Stamm sowie dem Keratoconjunctivitis auslösenden Stamm 3227/59 von S. enteritidis untersucht.

Material und Methoden

Die verwendeten Stämme — Sh. flexneri 2 6971/61, Sh. sonnei 13615/61, Sh. scholtensii 2492/61, E. coli 0124 Serény 10 und S. enteritidis 3227/59 — wurden auf Desoxycholat-Citrat-Agar nach Leifson aufbewahrt und anläßlich eines jeden Infektionsversuchs über das Tier passiert.

Augeninfektionen nahmen wir jeweils mit der von einer 3 mm-Öse gefaßten Keimmenge von 16 Std bebrüteten Blutagar-Subkulturen vor.

Die Immunitätsbeziehungen zwischen dem E. coli- und den drei Shigella-Stämmen wurden in 12 Tierversuchsgruppen — jeder gegen jeden —, die zwischen Shigellen und Salmonellen bestehenden Beziehungen nur durch kreuzweise Testung des Sh. flexneri 2 gegen den S. enteritidis-Stamm untersucht.

Die Versuchstiere wurden auf beiden oder nur dem einen Auge so lange wiederholt infiziert, bis der homologe Stamm keine oder nur noch abortive Erkrankung auslöste. Die doppelseitig immunisierten Tiere wurden dann auf dem einen Auge mit dem homologen, auf dem anderen mit dem zu testenden heterologen, die einseitig immunisierten auf beiden Augen mit dem heterologen Keim infiziert. Relative Immunität gegenüber dem heterologen Stamm ließ sich dabei am besten anhand der einseitig vorbehandelten Tiere objektivieren.

Jede Versuchsgruppe bestand aus mindestens zwei doppelseitig und zwei einseitig immunisierten Tieren. In allen denjenigen Fällen, wo sich nur relative Immunität nachweisen ließ, wurde die Versuchsgruppe um mindestens zwei weitere einseitig immunisierte Tiere erweitert. Insgesamt kamen 72 Meerschweinchen in den Versuch.

Ergebnisse

Homologe Immunität

Die durch vollvirulente Keime der Shigella-Gruppe oder des E. coli-Serotyps 0124 am unvorbehandelten Meerschweinchenauge ausgelöste Erkrankung beginnt mit einer eitrigen, meist von Blepharospasmus begleiteten Conjunctivitis, welche in der Regel 1—3 Tage post infectionem voll ausgeprägt vorliegt. Auf dem Höhepunkt der Conjunctivitis kommt es zur leukocytären Infiltration der Cornea, womit sich der Schwerpunkt der Erkrankung auf die Hornhaut verlagert. Wenige Tage post inf. klingt die Conjunctivalbeteiligung ab, die Lider öffnen sich wieder, und eine dicht eingetrübte Cornea wird sichtbar. Etwa zwischen dem 5. und dem 10. Tag post inf. wird das Hornhautepithel abgestoßen: die Cornea ist jetzt fleischrot verfärbt, ihre Oberfläche uneben. Vom Limbus herkommend schiebt sich in der Folge neues Epithel über die Hornhautoberfläche, die etwa 3—4 Wochen post inf. wieder epithelialisiert und glatt ist, aber noch eingetrübt erscheint. Die vollständige Restitution wird in der Regel 4—8 Wochen post inf. erreicht; in einer Minderzahl der Fälle entwickelt sich eine chronische Keratitis mit Ausbildung herdförmiger Infiltrate.

Die Reinfektion kann auf vollständige Immunität des vorbehandelten Auges stoßen und — in der Minderzahl der Fälle — von keinerlei Reaktion gefolgt sein. Häufig kommt es aber auch bei Vollimmunität zu kurzfristiger allergischer Conjunctivitis[5,6], die sich von einer abortiven Infektion nicht unterscheiden läßt. Relative Immunität dokumentiert sich in einer Verkürzung der Erkrankungsdauer

und einer Abschwächung der Symptome; bei vergleichender Untersuchung des Infektionsablaufs an beiden Augen ein und desselben Tieres gibt neben der Erkrankungsdauer auch die Dichte der Hornhauteintrübung ein gutes Kriterium für die Schwere der Erkrankung ab.

Das nicht vorbehandelte Auge einseitig immunisierter Tiere gewinnt zwar einen humoral bedingten, geringgradigen typspezifischen Schutz, bleibt aber für die Infektion mit heterologen Serotypen voll empfänglich[5,6].

Auch durch mehrmalig wiederholte Infektion mit demselben Stamm war volle Immunität — d. h. absolute Reaktionslosigkeit oder höchstens 2 Tage andauernde allergische Conjunctivitis — gegenüber homologen Keimen nicht immer zu erzielen. Selbst nach achtmaliger Reinfektion beantworteten manche Tiere die Keiminoculation noch mit einer flüchtigen Eintrübung der Cornea. Andererseits sahen wir in manchen Fällen schon nach der zweiten Infektion absolute Immunität. Am stärksten tendierte Sh. flexneri 2 dazu, die homologe — wie auch die heterologe — Immunität zu durchbrechen.

Der augenpathogene S. enteritidis-Stamm löste eine relativ leichte Conjunctivitis von etwa einwöchiger Dauer aus. Bei der überwiegenden Zahl der Versuchstiere kam es auch zu einer Mitbeteiligung der Hornhaut, die ihren Ausdruck in einer meist nur wenige Tage anhaltenden Eintrübung der Cornea ohne Ulceration fand.

Die histologische Untersuchung ergab 2 Tage post inf. eine lympho-plasmocytäre Keratitis mit beginnender Vascularisation neben einer lympho-plasmocytären Conjunctivitis (Dr. GÄRTNER, Universitäts-Augenklinik, Heidelberg).

Die homologe Reinfektion der von einer Salmonella-Infektion genesenen Tiere stieß auf absolute Immunität nicht nur des zweitinfizierten, sondern auch des unvorbehandelten Auges.

Heterologe Immunität

Um einigermaßen übersichtliche Werte zu erhalten, wurden die Resultate der Kreuzimmunitätsversuche nach folgenden Normen aufgeschlüsselt:

0 = absolute Reaktionslosigkeit; (+) = höchstens 3 Tage andauernde Conjunctivitis als Ausdruck allergischer Reaktion oder abortiver Infektion; + = kurzfristige leichte Keratitis mit geringfügiger Eintrübung der Cornea von höchstens einwöchiger Dauer; ++ = ausgeprägtere, aber gegenüber dem unvorbehandelten Auge deutlich abgeschwächte Keratoconjunctivitis (objektivierbar nur durch Vergleich der Infektionsabläufe am immunisierten und am unvorbehandelten Auge eines und desselben Tieres); +++ = Infektionsablauf unverändert.

Die Variationsbreite wechselnder Resultate wurde durch Angabe der schwächsten und der stärksten Reaktion gekennzeichnet.

Unsere Ergebnisse waren wie folgt:

Vorbehandlung mit:	Testinfektion mit:			
	Sh. flexneri 2	Sh. sonnei	Sh. scholtensii	E. coli 0124
Sh. flexneri 2	(+)/+	0/(+)	0/(+)	(+)
Sh. sonnei	(+)	(+)	(+)	(+)
Sh. scholtensii	+/++	(+)/++	0/(+)	0/(+)
E. coli 0124	++	++	+	0/(+)

	Sh. flexneri 2	S. enteritidis
Sh. flexneri 2	(+)/+	+++
S. enteritidis	+++	0

Während sich somit zwischen Sh. flexneri 2 und S. enteritidis keinerlei gewebsimmunologische Kreuzbeziehungen nachweisen ließen, gehören die anerkannten Shigellen, die provisorische Sh. scholtensii und der E. coli-Serotyp 0124:K 72 offensichtlich einem und demselben Gewebsimmunitätssystem an. Sh. flexneri 2 und Sh. sonnei verliehen dabei absolute postinfektiöse Immunität gegenüber der heterologen Reinfektion, Sh. scholtensii und E. coli 0124 hinterließen dagegen nur relativen Schutz.

Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit aufgedeckten gewebsimmunologischen Beziehungen zwischen Shigellen und E. coli 0124 sind ein weiterer Beweis für die enge systematische Zusammengehörigkeit dieser beiden Keimgruppen.

Auf Grund der vorliegenden Befunde kann nicht ausgeschlossen werden, daß der gewebsimmunogene Faktor der Shigellen und des E. coli-Serotyps 0124 komplexer Natur ist und bei Sh. scholtensii und E. coli 0124 nur in defektem Zustand vorliegt. Zieht man aber in Betracht, daß Sh. flexneri 2 auch die homologe Immunität häufiger durchbricht als die übrigen Keimtypen, so gewinnt eine andere Interpretation der Immunitätsdivergenzen größere Wahrscheinlichkeit: Der offensichtlich virulentere Flexner- und Sonne-Stamm zwingt den Makroorganismus in stärkerem Ausmaß zur Auseinandersetzung mit seinen immunogenen Bestandteilen, als dies bei Sh. scholtensii und E. coli 0124 der Fall ist. Berücksichtigt man weiterhin, daß eben diese größere Virulenz die betreffenden Keime auch befähigt, eine bestehende Immunität in stärkerem Ausmaß zu durchbrechen, erklären sich die zwischen Sh. flexneri 2 und Sh. sonnei einerseits, Sh. scholtensii und E. coli 0124 andererseits bestehenden Divergenzen eher als Ausdruck quantitativer Virulenzunterschiede, denn als Hinweis auf qualitative Differenzen im Aufbau des gewebsimmunogenen Faktors.

Sofern man unterstellt, daß das gewebsimmunogene Substrat mit dem spezifischen pathogenetischen Prinzip identisch ist, ließe sich aus den Kreuzimmunitätsbefunden schließen, daß das für die Enteropathogenität verantwortliche Substrat in verschiedenen Keimtypen in verschiedener Menge vorliegt und von Sh. flexneri 2 über Sh. sonnei und Sh. scholtensii nach E. coli 0124 quantitativ abfällt. Da die phylogenetische Ausbildung des Shigella-Biotyps auf irgendeinem Selektionsvorteil beruhen muß, liegt die Annahme nahe, daß hier eine Gesetzmäßigkeit regiert, nach der der shigellaähnlichere Biotyp besser für das parasitäre Leben ausgerüstet ist als der coliähnliche.

Zusammenfassung

Die Shigellen und der enteropathogene E. coli-Serotyp 0124:K72 (B17) besitzen einen gemeinsamen gewebsimmunogenen Faktor.

Gewisse Differenzen im Umfang der heterologen Gewebsimmunität beruhen wahrscheinlich eher auf quantitativen als auf qualitativen Unterschieden im Bestand der für die Virulenz und die Immunogenität verantwortlichen Substrate.

Ein Keratoconjunctivitis auslösender S. enteritidis-Stamm wies keine Beziehungen zum Gewebsimmunitätssystem der Coli-Shigella-Gruppe auf.

Unser Dank gilt Herrn Dr. Gärtner, Universitäts-Augenklinik, Heidelberg, für die Durchführung der histologischen Untersuchungen am Salmonella-infizierten Meerschweinchenauge und Herrn Dr. Serény, Staatliches Institut für Hygiene, Budapest, für die Überlassung schleimhautpathogener E. coli 0124-Stämme.

Literatur

[1] Gekker, V. D., J. A. Belaya and E. T. Melnik: Experimental keratoconjunctivitis as a model for the study of dysentery. J. hyg. epidem. microbiol. imm., Prag **1**, 70 (1957).

[2] Manolov, D. G.: A study of some questions of pathogenicity and immunity in dysentery using experimental models of Shigella keratoconjunctivitis in guinea pigs. J. hyg. epidem. microbiol. imm., Prag **1**, 322 (1957).

[3] Serény, B.: Experimental Shigella keratoconjunctivitis. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **2**, 293 (1955).

[4] Serény, B.: Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **4**, 367 (1957).

[5] Serény, B.: Acquired natural immunity following recovery from keratoconjunctivitis shigellosa. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **5**, 343 (1958).

[6] Serény, B.: Keratoconjunctivitis shigellosa. Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig. **178**, 325 (1960).

[7] Stenzel, W.: Untersuchungen über die Schleimhautpathogenität einiger Enterobacteriaceen-Gruppen im Bingelschen Versuch. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 123 (1960).

[8] Stenzel, W.: Sh. scholtensii und Sh. manolovii — zwei zur Untergruppe D zu stellende provisorische Shigella-Typen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 433 (1962).

[9] Szturm-Rubinstein, S., et D. Piéchaud: Facteur kérato-conjonctival des Shigella. Ann. Inst. Pasteur **95**, 763 (1958).

Dr. W. Stenzel,
Hygiene-Institut der Universität, 69 Heidelberg, Thibautstr. 2

Zeitschrift f. Hygiene 148, 517—538 (1962)

Aus der Bayerischen Landesimpfanstalt, München
(Vorstand: Prof. Dr. A. Herrlich)

Experimentelle Untersuchungen über das Antikörperbild des Rindes nach einer Infektion mit dem Vaccinevirus (Poxvirus officinale) *

Von
Hans Adldinger

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Mai 1962)

Bei den Pocken erwirbt der Kranke und später der Rekonvaleszent im Verlaufe und mit Überstehen der Infektion eine ausgeprägte, aktive Immunität. Sie äußert sich dadurch, daß eine Zweiterkrankung über längere Zeit hinweg nicht mehr auftritt.

Die Pockenimmunität ist in ihrer Gesamtheit stets komplexer Natur. Sie beruht auf der antigenen und immunisierenden Wirksamkeit der einzelnen Viruspartikelchen und setzt sich aus *cellulären* und *humoralen* Abwehrmechanismen zusammen.

Die *humoralen Abwehrmechanismen* finden in der Bildung von virusneutralisierenden Antikörpern ihren Ausdruck. Die anderen virusspezifischen Antikörperarten, die im Verlaufe einer Infektion im Serum auftreten, sind die Folge der komplexen Antigenstruktur des sich vermehrenden Virus und dürften direkt für das Immunisierungsgeschehen nicht verantwortlich sein. Sie können als eine Teilerscheinung der Auseinandersetzung zwischen Virus und Zelle und zwischen Virus-Zellsystem und Organismus aufgefaßt werden und haben eine große Bedeutung nicht nur für die Diagnose, sondern vor allem für die Pathogenese einer Pockeninfektion erlangt.

Bei den einzelnen Pockenformen hat man bisher neben virusneutralisierenden Antikörpern komplementbindende, präcipitierende, agglutinierende und hämagglutinationshemmende Antikörper im Serum gefunden. Dabei ist auffällig, daß es erstens nicht bei jeder Verlaufsform zur Ausbildung aller dieser Antikörperarten kommt und zweitens, daß die einzelnen Antikörperarten zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion im Serum auftreten und unterschiedlich lang persistieren.

Nach dem bisherigen Wissen scheint eine Beziehung zwischen dem Antikörperbild und der Pathogenese einer Pockeninfektion zu bestehen.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Für die meisten experimentellen Studien über die Pocken benutzte man als Modell die Infektion mit dem Vaccinevirus. Über das Antikörperbild der Vaccineinfektion beim Menschen und bei verschiedenen Tieren sind bereits Untersuchungen durchgeführt worden. Über das Antikörperbild des Rindes nach einer Infektion mit dem Vaccinevirus ist jedoch noch wenig bekannt, obwohl seit mehr als 50 Jahren der Pockenimpfstoff für die Vaccinierung des Menschen vom Rinde gewonnen wird.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb näher mit dem Antikörperbild des Rindes nach verschiedenartigen, experimentellen Vaccinevirus-Infektionen, wobei neben der Qualität und Quantität der einzelnen Antikörper besonders das zeitliche Nacheinander im Erscheinen der Antikörperarten und ihre Verweildauer im Serum in Beziehung zur Klinik der Impftiere studiert werden sollen.

Die ersten Anhaltspunkte über die Bildung von Hemmstoffen im Serum vaccinevirusinfizierter Organismen lieferten die Untersuchungen von RAYNAUD[36] sowie STRAUS, CHAMBON u. MÉNARD[42]. Sie stellten fest, daß die Vaccineimpfung bei solchen Kälbern keinen Erfolg zeigte, die vorher eine Transfusion größerer Blutmengen von vaccinierten Kälbern erhalten hatten. STERNBERG[41] beobachtete 1892, daß bei der Beimpfung der skarifizierten Haut eines Kalbes mit Pockenlymphe, die vorher mit dem Serum eines pockengeimpften Kalbes vermischt worden war, die Entwicklung von Pockeneffloreszenzen verhindert oder gehemmt wurde. STERNBERG schloß aus diesem Experiment, daß im Serum vaccineimmuner Tiere Stoffe enthalten sein müssen, die das Virus abtöten. BÉCLÈRE, CHAMBON u. MÉNARD[2] verwendeten Sternbergs Prinzip des „viruliziden Versuches" in ausgedehnten Versuchsreihen mit Kälbern, Pferden und geimpften Menschen und bestätigten dessen Erfahrungen .Etwa zur gleichen Zeit erhielt LÖFFLER[23] ähnliche Befunde bei der Infektion mit dem Virus der Maul- und Klauenseuche.

Damit war die Aufmerksamkeit auf die besondere Beschaffenheit des Blutserums von virusgeimpften oder -infizierten Tieren und Personen gelenkt, und in der Folgezeit haben viele Autoren über den Nachweis von „viruliziden Eigenschaften" des Blutes berichtet. Daß es sich bei dieser antiviralen Wirksamkeit des Immunserums nicht um eine Abtötung des Virus handelt, wurde erst später erkannt. ANDREWES[1] bewies 1928 am Beispiel der Vaccineinfektion, daß die Wirkung des Immunserums auf einer mehr oder weniger reversiblen Virus-Antikörperreaktion im Sinne einer Neutralisation beruht. Zur gleichen Zeit kamen TODD[44] bei Untersuchungen mit dem Virus der Hühnerpest und BEDSON[3] mit dem Herpesvirus zu derselben Ansicht.

Die Auffindung weiterer spezifischer Aktivitäten des Immunserums ging Hand in Hand mit der Entwicklung neuer serologischer Untersuchungsmethoden sowie mit Fortschritten in der Virusforschung im allgemeinen. FREYER[12] stellte 1904 erstmals die spezifisch präzipitierende Wirkung des Serums vaccineinfizierter Kaninchen fest. TOMARKIN u. SUAREZ[45] fanden besonders mit Hilfe der Thermopräcipitation spezifische Präcipitine im Serum vaccinierter Kaninchen und Rinder. PASCHEN[34] beobachtete 1913 ein „Agglutinationsphänomen" der Vaccine-Elementarkörperchen bei Vermischung mit homologem Kaninchen-Hochimmunserum. Mit der 1901 von BORDET u. GENGOU entwickelten Komplementbindungsreaktion fand man schließlich komplementbindende Antikörper auch im Serum vaccinevirusinfizierter Organismen. Besonders GASTINEL[13] hat in gründlichen Untersuchungen beim Menschen, Kaninchen, Kalb, Affen und Hund komplementbindende Fähigkeiten des Vaccineserums nachgewiesen. Beim vaccinierten Rind kamen dagegen JOBLING[21] sowie

Heller u. Tomarkin[15] immer zu negativen Befunden. 1941 wurde die Entdeckung einer weiteren Wirkungskomponente im Immunserum vieler Virusinfektionen eingeleitet. Hirst[20] beobachtete, wie Hühnererythrocyten durch eine Aufschwemmung von Influenzavirus agglutiniert wurden. Die Agglutination ließ sich mit spezifischen Immunseren hemmen oder aufheben. Nagler[31] bestätigte 1942 das Hirstsche Phänomen und die Hämagglutinationshemmung durch Immunserum auch beim Vaccinevirus.

Die Antikörperbildung in vaccineinfizierten Organismen wurde seit Sternberg[41] von zahlreichen Autoren bestätigt. Man fand Antikörper bei der Vaccineinfektion des Menschen und zahlreicher Tiere. Eine genaue Analyse der Bildung der einzelnen Antikörperarten und die zeitliche Zuordnung ihres Erscheinens zueinander erfolgte jedoch erst in jüngerer Zeit, nachdem die einzelnen Nachweismethoden und die Herstellung spezifischer Antigene mehr und mehr verfeinert worden waren.

Beim *Menschen* fanden McCarthy, Downie u. Bradley[28] bei fast allen Erst- und Wiederimpflingen neutralisierende Antikörper. Nach der Erstimpfung erschienen sie am 13. Tage, nach der Wiederimpfung bereits am 7. Tag in der Blutbahn und waren 10—20 Jahre nach der Erstimpfung noch nachweisbar.

Herrlich, Mayr u. Epp[18] kamen in jüngsten Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie stellten weiterhin fest, daß die Menge der virusneutralisierenden Serumantikörper stets sehr gering ist.

Hämagglutinationshemmende (HAH)-Antikörper werden bei der Vaccineinfektion des Menschen auch nahezu regelmäßig gebildet. Nach Collier[9] sowie Herrlich, Mayr u. Munz[19] und Herrlich, Mayr u. Epp[18] erscheinen sie um den 10. Tag post infectionem (p.i.) im Serum, wo sie jahrelang verweilen. Bei Wiederimpflingen können sie gelegentlich, trotz vorhandener Immunität, fehlen. Bingel u. Kruse[7] wiesen darauf bei der Erwachsenen-Impfung ebenfalls hin. Szathmáry u. Holik[43] zeigten anläßlich ihrer Untersuchungen über Serumantikörper von Neugeborenen pockengeimpfter Mütter, daß in den ersten Monaten diaplacentar übergegangene HAH-Antikörper vorhanden sein können.

Beim Nachweis von spezifischen komplementbindenden (KB)-Antikörpern ist zwischen S- und V-Antikörpern zu unterscheiden. Das S-Antigen scheint nach Mayr, Herrlich u. Mahnel[24] nur eine schwache antigene Wirksamkeit zu besitzen. Sie konnten bei Erst- und Wiederimpflingen keine S-Antikörper nachweisen.

V-Antikörper waren nach Herrlich, Mayr u. Munz[19] nur bei einer revaccinierten, erwachsenen Person zu finden, die in ständigem Kontakt mit dem Vaccinevirus stand. Mit einem gemeinsamen Antigen aus V- und S-Komponenten kamen Bingel u. Kruse[7] bei den Seren von 101 wiedergeimpften Erwachsenen zu 28 positiven Befunden. McCarthy, Downie u. Bradley[28] stellten in weniger als der Hälfte ihrer Erst- und Wiederimpflinge KB-Antikörper fest. Sie traten nicht vor dem 10. Tag p.i. auf. Rohde, Schneeweiss u. Kühn[38] registrierten KB-Antikörper bei Erstimpflingen in 42% und bei Wiederimpflingen in 34% der Fälle. Ab der 2. Woche waren sie bis 5 Monate p.i. nachweisbar.

Nach Untersuchungen von Herrlich, Mayr u. Epp[18] scheint die Bildung präcipitierender Antikörper erst mit zunehmendem Alter stärker angeregt zu werden. Ein gehäuftes Auftreten zwischen dem 17. und 22. Tag p.i. fanden sie interessanterweise bei Impfkomplikationen.

Bei Rhesusaffen und Rhesus-Pavian-Bastarden gelang HERRLICH, MAYR u. MUNZ[19] im Verlauf der Vaccineinfektion ein Antikörpernachweis in der Hämagglutinations- und Komplementbindungsreaktion. Bei jungen Rhesusaffen waren im Verlauf der Vaccineinfektion V- und HAH-Antikörper, aber keine S-Antikörper im Serum feststellbar. Die HAH-Antikörper waren bereits ab dem 6. Tag p.i., die V-Antikörper 2 Tage später nachzuweisen. Die HAH-Titer stiegen daraufhin rasch bis auf über 1:3000 an und waren am 244. Tag p.i. noch mit Werten um 1:270 im Blut vorhanden. Die V-Antikörper wurden um den 200. Tag aus der Blutbahn ausgeschieden. Sie hatten vorher nur niedrige Titer (mittlerer Höchstwert 1:37) erreicht. Bei ausgewachsenen Rhesus-Pavian-Bastarden kam es nach den Verfassern lediglich zur Bildung von HAH-Antikörpern, die am 8. Tag p.i. erschienen und nach 5 Monaten noch Titer um 1:128 aufwiesen.

Beim Schwein liegen Untersuchungen von MAYR[24] vor. Nach cutaner Impfung traten HAH-Antikörper ab dem 8. Tag p.i. auf und waren bis zum 105. Tag nachweisbar. Die Höchstwerte lagen bei 1:512 am 20. und 22. Tag p.i. In der Präcipitationsreaktion reagierten die Seren ebenfalls vom 8. Tag an positiv. Bis zum 17. Tag nahm die Stärke der Reaktion im Agar zu. Am 105. Tag p.i. wurden noch präcipitierende Antikörper angezeigt.

Nach i.v. Infizierung wurde die Antikörperbildung früher angeregt. Präcipitierende- und HAH-Antikörper waren schon am 7. Tag p.i. erfaßbar. Die Höchstwerte (am 17. Tag) bzw. stärksten Reaktionen übertrafen zwar nicht die nach der cutanen Impfung, blieben aber länger erhalten. Am 105. Tag waren beide Antikörperarten noch nachweisbar.

Neutralisierende Antikörper haben WITTMANN u. MAYR[47] an cutan infizierten Ferkeln ab dem 9. Tag p.i. nachgewiesen.

Beim *Huhn* sind von WITTMANN[46] sowie WITTMANN u. MAYR[47] nach cutaner Infektion (Federfollikel-Methode) bisher HAH-, präcipitierende und neutralisierende Antikörper gefunden worden. Am 10. Tag p.i. begannen die Neutralisationsindices anzusteigen. Die HAH-Werte hatten zur selben Zeit mit 1:16 schon einen signifikanten Titer. Der Höhepunkt lag für beide Antikörperarten am 20. Tag p.i., anschließend sanken die Werte allmählich ab. Die Bildung der präcipitierenden Antikörper war schwach. Positive Reaktionen konnten nur am 10. Tag p.i. erzielt werden.

Beim *Kaninchen* erreichte COLLIER[10] durch i.p.-Injektion von Büffelvaccinepustelmaterial die Bildung hoher HAH-Titer im Serum. HERRLICH, MAYR u. MUNZ[19] bestätigten diesen Befund nach cutaner Impfung. Sie stellten außerdem noch niedrige Werte von V- und S-Antikörpern fest, die aber rasch wieder aus der Blutbahn verschwanden.

Untersuchungen über die experimentelle Vaccineinfektion *des Rindes* sind vor allem von PUNTIGAM u. BERGER[4,5,6] bekannt. Bei den Angaben über Veränderungen des weißen Blutbildes nach cutaner, intracutaner und subcutaner Impfung (BERGER u. PUNTIGAM 1953) werden auch die „viruliziden" Antikörper erwähnt. Die Autoren ließen Serumverdünnungen und Virussuspensionen, zu gleichen Teilen gemischt, 2 Std bei Zimmertemperatur und weitere 20 Std bei 2° C binden und verimpften anschließend 0,1 ml des Gemisches intracutan auf Kaninchen. Die Ablesung der Resultate erfolgte nach 4 Tagen, wobei als Neutralisationstiter der Rinderseren die Serumverdünnung galt, bei der noch keine spezifische Reaktion an der Injektionsstelle festzustellen war. Es zeigte sich, daß bei den cutan geimpften Rindern die ersten Antikörper zu Beginn der 2. Woche auftraten und ihr Titer anfangs rasch anstieg. Die Höchstwerte lagen bei einer Serumverdünnung von 1:64. Bei den intra- und subcutan infizierten Rindern verlief der Tieteranstig deutlich protrahiert und

erreichte nur Werte von 1:8 bzw. 1:4. Auch hier waren die Antikörper zu Beginn der 2. Woche in der Blutbahn nachzuweisen.

Munz u. Mahnel[30] konnten bei massiv geimpften Jungstieren und Kaninchen mit Hilfe des Neutralisationstests in Gewebekulturen Neutralisationsindices von 9—9,5 ermitteln. Das entspricht einer Neutralisationsfähigkeit des Serums von nahezu 500 Viruseinheiten pro 0,1 ml.

Angaben über die anderen Antikörperqualitäten des Rindes nach einer Vaccineinfektion konnten aus der neueren Literatur nicht entnommen werden.

A. Materialien und Methoden

1. Virusstämme

In sämtlichen Versuchen kamen die Dermovaccinestämme CVA und CVB zur Anwendung. Die Vaccinen, zum Teil seit Jahren über Esel-Kalb-Passagen gelaufen (CVA), lagen als mehrfache Kalb-Kalb-Passagen vor. Der Stamm CVB ist als Pockenimpfstoff zur Zeit im öffentlichen Verkehr. Die biologischen Daten im bebrüteten Hühnerei, im Kaninchen und beim Menschen sind von Herrlich u. Mayr[16] beschrieben worden.

2. Virusantigene

Zur Bereitung der für die einzelnen serologischen Untersuchungen erforderlichen, virusspezifischen Antigene dienten

a) Pustelmaterial (Pulpa) cutan mit Vaccinevirus infizierter Jungrinder,

b) Chorioallantoismembranen vaccineinfizierter, bebrüteter Hühnereier und

c) Virusernten aus vaccineinfizierten HeLa-Zellkulturen.

a) Dermovaccineantigen. Die Rinderpulpa wurde am 5. Tag p.i. abgenommen und 1:5 mit gepufferter, phys. Kochsalzlösung (pH-Wert 7,1) im Eisbad homogenisiert. Das anschließend 30 min bei 3000 U/min abzentrifugierte Sediment wurde mit sterilem Seesand im Mörser verrieben und, im Überstand aufgeschwemmt, erneut 30 min bei 3000 U/min ausgeschleudert. Dieser Überstand stellte das gebrauchsfertige Antigen dar, bei dem also eine Aufspaltung in die vom Viruselementarkörperchen abtrennbare und in die an das Elementarkörperchen gebundene Komponente unterblieb. Sein Infektionstiter im Ei lag bei 10^{-6} Ei-ID_{50}/0,1 ml (siehe Titrierungen). Es wurde in der Komplementbindungs- und Präcipitationsreaktion verwendet.

b) Eihautantigen. Die Chorioallantoismembranen 10—12 Tage vorbebrüteter Hühnereier wurden mit Vaccinevirus der genannten Stämme mit einer so niedrigen Animpfdosis infiziert, daß die Embryonen die primäre Virusphase überlebten und eine Generalisierung des Virus erfolgte. Dies ist nach Herrlich u. Mayr[17] günstig, weil bei stark generalisierten Chorioallantoismembranen die Virusausbeute wesentlich höher ist. Bei nicht erfolgter Generalisierung können dagegen nur die spezifisch veränderten Primärherde verwertet werden. Die am 3.—4. Tage 4+-generalisierten Membranen wurden gesammelt, in steriler, gepufferter phys. Kochsalzlösung (pH-Wert 7,1) gewaschen und ebenfalls mit Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5 verrieben. Danach wurde die Suspension 15 min bei 4000 U/min zentrifugiert und der so gereinigte Überstand als Antigen verwendet. Eine Aufspaltung in die virusgebundene und vom Virus abtrennbare Komponente erfolgte nicht, da dies nach Mayr[25] zum

Nachweis von hämagglutinationshemmenden Antikörpern in Seren vaccineinfizierter Organismen nicht zweckmäßig ist. Das Antigen wurde in der Hämagglutinations- und Hämagglutinationshemmungsreaktion (vergleichsweise auch in der Präcipitationsreaktion) verwendet. Es wies einen Infektionstiter um 10^{-7} Ei-ID_{50} auf.

c) Vaccineantigen aus Gewebekulturen. Vaccinevirus vom Stamm CVB, das mehrmals auf Hühnerfibroblasten- und embryonalen Kälbermuskel-Zellkulturen passiert worden war, wurde im Verlauf mehrerer Passagen an HeLa-Zellkulturen adaptiert. Dabei kamen jeweils 100000 Viruseinheiten/0,1 ml aus der letzten Passage zur Verimpfung, die in das Kulturmedium (siehe unten) erfolgte. Das Vaccinevirus verursacht im Verlauf seiner Vermehrung in den Kulturzellen deren Degeneration bis zur völligen Zerstörung und Auflösung. Sind die Zellen auf dem Boden des Kulturgefäßes zu einem geschlossenen und möglichst einschichtigen Rasen ausgewachsen, kann man im Mikroskop den cytopathischen Effekt (CPE) des Virus in seiner Progression verfolgen. Zur Antigengewinnung wurden nur diejenigen Kulturen herangezogen, in denen die Stärke des cytopathischen Effektes den Schluß zuließ, daß sich das Virus stark vermehrt hatte. Da das Vaccinevirus in der Regel eine starke Verhaftung mit dem Plasma der virusproduzierenden Zelle zeigt und nicht spontan abgegeben wird, wurde eine weitgehende Zerstörung der Zellkultur, einhergehend mit der Auflösung der Einzelzellen, abgewartet. Dies war bereits nach 24—30stündiger Bebrütung bei 37° C der Fall. Um eine optimale Virusausbeute zu erreichen, wurde die Zellauflösung auf physikalischem Wege durch Einfrieren bei — 20° C und rasches Auftauen der Kulturen bei Zimmertemperatur noch intensiviert. Die im Kulturmedium nunmehr aufgeschwemmten Zelltrümmer wurden 20 min bei 3000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand stellte das fertige Antigen für den Neutralisationstest und vergleichsweise auch für die Hämgaglutinationshemmungs- und Präcipitationsreaktion dar. Nach Feststellung des Infektionstiters, im Ei $10^{-5,5}$ ID_{50}, auf HeLa-Zellen $10^{-5,1}$ KID_{50} (siehe Titrierungen), wurde das Antigen in kleinen Gebrauchsmengen (5 ml) in Ampullen steril abgefüllt und bis kurz vor dem jeweiligen Versuch bei — 20° C aufbewahrt.

3. Zellkulturen

DULBECCO[11] entwickelte 1952 die Methode der partiellen Trypsin-Andauung von lebendem Gewebe zur Gewinnung der Ausgangszellen für eine fortlaufende Zellkultur.

Mit Hilfe dieser Technik explantierten SCHERER, SYVERTON u. GEY[39] Zellen aus einem menschlichen Cervixcarcinom. Sie entwickelten daraus einen permanenten Zellstamm, der unter der Bezeichnung HeLa in vielen Laboratorien, auch in der Bayerischen Landesimpfanstalt, in kontinuierlichen Passagen kultiviert wird. HeLa-Zellen vermehren sich rasch und sind für das Vaccinevirus gut empfänglich. Sie wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit zur Anzucht des Virusmaterials für den Neutralisationstest und im Test selbst verwendet.

Als Kulturmedien bewährten sich in der Bayerischen Landesimpfanstalt folgende Lösungen:

a) Anzuchtmedium

NaCl	7,18	$NaHCO_3$	1,10
KCl	0,40	Glucose	4,50
$CaCl_2$ (wasserfrei)	0,20	Yeast	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,20	Lactalbumin	5,0
Na_2HPO_4	0,125	Aqua bidest ad	1000,0

Dazu 0,05 g Phenolrot als p_H-Indicator, 10% Kälberserum, 100 E/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin. Der p_H-Wert wurde mit $NaHCO_3$-Lösung auf 7,2 eingestellt und die Lösung dann mit Seitz-EKS-Filter steril filtriert.

b) Erhaltungsmedium für die Zellen während des Neutralisationstests (NT). Reine, steril filtrierte Rinderamnionflüssigkeit (RAF) mit Antibioticazusatz und p_H-Wert wie unter a).

c) Nährmedium für die Zellen während der Virusproduktion. Tissue Culture Medium (TCM) 199 nach Morgan, Morton u. Parker[29]. Das Medium enthält in gepufferter isotonischer Salzlösung die notwendige Anzahl an Aminosäuren, Vitamine, verschiedene Zucker, Purine, Enzyme, Spurenelemente und andere Stoffe. Ferner müssen 2—5% Kälberserum sowie Antibiotica zugesetzt werden. Die p_H-Wert-Einstellung erfolgt mit $NaHCO_3$ auf 6,9.

Die mit der Zellsuspension beschickten Gefäße wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C so eingelegt, daß die Zellen auf eine große, ebene Glasfläche sedimentieren und allmählich zu einem geschlossenen, einschichtigen Zellrasen auswachsen konnten. Bei einer Einsaat von 150000 Zellen pro Kubikzentimeter (Auszählung nach Kristallviolettfärbung in der Zählkammer) vermehrten sich die Zellen so rasch, daß innerhalb von 2—3 Tagen eine lückenlose Zellschicht die Glaswand bedeckte.

Von dichten Kulturen wurden Subkulturen angelegt, bevor die Zellen mehrschichtig weiterwachsen und sich wegen Nahrungsmangels und Änderungen der Spannungsverhältnisse von der Glaswand ablösen konnten. Dabei wurde wie folgt verfahren:

Das Nährmedium wurde abgesaugt und durch Trypsinlösung (0,25% Difco-Trypsin in phosphatgepufferter Salzlösung) ersetzt. Nach wenigen Minuten der Einwirkung (im Brutschrank bei 37° C) löste sich der Zellrasen von der Glaswand ab und bei leichtem Schwenken des Gefäßes in kleine Stückchen auf. Danach wurde 3 min bei 1000 U/min zentrifugiert und der zellfreie Überstand abgesaugt. Das Sediment, in frischem Nährmedium aufgeschwemmt, wurde mit einer Spritzenpipette so lange gemischt, bis alle sichtbaren Zellhäufchen zu Einzelzellen zerkleinert waren. Eine kleine Menge der Suspension wurde mit Kristallviolett gefärbt und in der Zählkammer ausgezählt. Für die Weiterzucht kam eine Konzentration von 150000 Zellen pro Kubikzentimeter, in den Neutralisationsröhrchen 300000 Zellen/cm³ zur Einsaat.

Als Kulturgefäße dienten für die Vermehrung des Virus große, mit Gummistopfen verschließbare Glasflaschen (Roux-Schalen und Vierkant-Kolben) mit breiten, planen Seitenwänden und für die Titrierungen und Neutralisationstests Reagensglasröhrchen mit einer lichten Weite von 10 mm. Roux-Schalen wurden mit 100 ml, Vierkant-Kolben mit 20 ml und Reagensglasröhrchen mit 1 ml Zellsuspension beschickt.

4. Virustitrierungen

Die Virusstammlösungen kamen in steigenden Verdünnungen entweder auf der gesenkten Chorioallantoismembran (CAM) 10 Tage bebrüteter Hühnereier oder in HeLa-Röhrchenkulturen zur Verimpfung. Die Titerangaben beziehen sich auf jeweils 0,1 cm³ der Stammlösungen. Ihre Berechnung erfolgte nach der 50%-Methode von Reed u. Muench[37]. Die Titer wurden entweder als Ei-infektiöse Dosen 50% ($Ei\text{-}ID_{50}$) oder Kultur-infektiöse Dosen 50% (KID_{50}) angegeben.

5. Infektionstechnik, Normal- und Immunserum

Für die Untersuchungen des Antikörperbildes wurden insgesamt sieben Jungrinder im Alter zwischen 1 und 2 Jahren herangezogen. Fünf davon waren Tiere, die

in der Bayerischen Landesimpfanstalt zur routinemäßigen Herstellung von Pockenimpfstoff verwendet worden waren. Zwei Rinder, die vom Tierhygienischen Institut der Universität München zur Verfügung gestellt wurden, dienten als Vergleichstiere. Die Infektion der Tiere erfolgte bei der ersten Tiergruppe im Rahmen der Pockenimpfstoffgewinnung nach der an der Bayerischen Landesimpfanstalt üblichen cutanen Methode. Dabei wird das Impftier auf einem besonderen Impftisch mit Gurten fixiert und das Impffeld, das die Haut der Bauchdecke, der hinteren Brustpartie, der inneren Oberschenkelflächen, des Scrotums und des Dammes umfaßt, durch Rasieren, Waschen und Desinfizieren vorbereitet. Beruhigung und Analgesie werden durch Combelen und Polamivet erreicht. Anschließend wird die Haut des Impffeldes skarifiziert und der Impfstoff in die Haut eingerieben.

Die Vergleichstiere wurden nach einer Methode infiziert, die der cutanen Schnittimpfung bei der Pockenschutzimpfung des Menschen weitgehend entspricht. Innerhalb eines kleinen, wie oben vorbereiteten Impffeldes wurden mit einer Impflanzette fünf Schnitte von 10 cm Länge schachbrettartig angebracht. Der Impfstoff floß dabei während des Ritzens in die oberen Schichten der Haut ein.

Während der Beobachtungszeit von 7 Wochen wurde in bestimmten Abständen zur Gewinnung der Serumproben von den infizierten Rindern Blut entnommen, und zwar durch Punktion der Vena jugularis. Die Normal-Rinderseren für die verschiedenen serologischen Kontrollen stammten sowohl von den Impftieren vor der Impfung als auch von zur Schlachtung am Münchener Schlachthof bestimmten Rindern. Alle aus dem Vollblut in üblicher Weise gewonnenen Seren wurden bei $-20°$ C aufbewahrt.

6. Hämagglutinations(HA)- und Hämagglutinationshemmungsreaktion (HAH)

Zur Anwendung kam das von MAYR[25] für die Pockenviren modifizierte Salksche Verfahren:

In einem *Vorversuch* (HA) wurden Hühnererythrocyten vom weißen Leghorn, die dreimal mit phys. Kochsalzlösung gewaschen worden waren, geprüft und die Antigene ausgetestet. 0,3 cm³ einer 0,5%igen Hühnererythrocytenaufschwemmung in phys. Kochsalzlösung wurden mit je 0,3 cm³ einer fallenden Verdünnungsreihe des 30 min bei 56° C inaktivierten Antigens vermischt, für 1 Std ins Wasserbad bei 37° C gebracht und nach einer weiteren Stunde bei Zimmertemperatur abgelesen.

In der *Hämagglutinationshemmung* kam der vierfache Endtiter des Antigens zur Anwendung. Serum und Antigen wurden $^1/_2$ Std bei 56° C inaktiviert, vom Serum mit der 0,5%igen Hühnererythrocytenaufschwemmung (1. Röhrchen 1%ige Hühnerblutkörperchenaufschwemmung) eine Verdünnungsreihe hergestellt, beginnend bei der Verdünnung 1:4; dann wurde die gleiche Menge Antigen zugesetzt, für 1 Std ins Wasserbad bei 37° C gestellt, 1 Std bei Zimmertemperatur belassen und dann abgelesen. Als Endtiter galt das letzte Röhrchen, das noch eine vollständige Hemmung der Agglutination zeigte.

7. Präcipitationsreaktion (PR)

Sie wurde mit Hilfe des Agardiffusionsverfahrens nach OUDIN[32] und OUCHTERLONY[33] durchgeführt:

Den Agar (15 g Agar Agar pulv. subt.-Merck gelöst in 985 ml 1%iger NaCl-Lösung) stellt man auf p_H 7,0 ein und füllt ihn nach Sterilisation zu je 3 ml in sterile Petri-Schalen mit einem Innendurchmesser von 4,5 cm ab. Nach dem Erstarren stanzt man aus ihm fünf Löcher, und zwar eines zentral und vier peripher mit einem

Randabstand von 8 mm. Die Löcher sollen einen Durchmesser von 4 mm haben. In das Zentralloch gibt man das Antigen, in die peripheren Löcher die inaktivierten (30 min 56° C) Seren. Antigen und Seren werden im Abstand von 24 Std dreimal bis zum Lochrand nachgefüllt. Die Reaktion findet bei Zimmertemperatur statt und wird täglich kontrolliert. In der Regel kann man einen positiven Ausfall nach 2—5 Tagen erkennen. Die während dieser Zeit aufgetretene stärkste Reaktion wird für die endgültige Bewertung herangezogen. Nach Mayr[26] können nach dem 5. Tag gelegentlich unspezifische Mitreaktionen mit Werten um ± auftreten, die dann aber, im Gegensatz zu spezifischen Reaktionen, nie an Stärke zunehmen. Eine Bewertung nach dem 5. Tage ist aus diesem Grunde unsicher. Die Ablesung erfolgt bei abgenommenem Deckel im schräg einfallenden Tageslicht gegen einen dunklen Hintergrund. Die Bewertung ist ± = fraglich, + positiv, ++ stark positiv. Mehrere Präcipitationsbanden werden in Richtung Serumpot—Antigenpot einzeln abgelesen und durch ein Komma getrennt protokolliert.

8. Komplementbindungsreaktion (KBR)

Zunächst wurde die von Siegert u. Mitarb.[40] für die Diagnose des Q-Fiebers, der Influenza, des Mumps und menschlicher Newcastle-Infektionen modifizierte Kolmer-Technik angewandt:

In zwei Vorversuchen wurden die Titer des Amboceptors und des Komplements bestimmt. Zur Anwendung kamen dann zwei Amboceptor- und zwei komplementbindende Einheiten. Das Antigen wurde gegen ein Serum mit bekanntem Titer und die zu untersuchenden Seren in fallenden Verdünnungsreihen, beginnend mit einer Verdünnung 1:4, gegen eine konstante Antigenmenge (zwei Antigeneinheiten) ausgetestet. Als positive Komplementbindungsreaktion wurden nur vierfach positive Röhrchen gewertet. Serum-, Amboceptor-, Antigen- und Komplementkontrollen liefen bei allen Versuchen mit.

Die Komplementbindungsreaktion wurde außerdem in Anlehnung an ein Verfahren durchgeführt, das Marucci[27] beschrieben hat und das von Korn u. Truszczynski[22] für die Maul- und Klauenseuche bestätigt worden ist. Das Prinzip des direkten Antikörpernachweises bei Verwendung der Kältebindung nach Kolmer ist beibehalten worden, gegenüber der vorher beschriebenen Methode ergeben sich jedoch folgende Abweichungen:

a) Als Verdünnungsflüssigkeit wird in allen Fällen ein eisgekühlter Veronalpuffer mit Ca- und Mg-Ionenzusatz (p_H-Wert 7,4) verwendet, um eine optimale Komplementfunktion zu gewährleisten.

b) Um Protein- oder Virusverluste in geringsten Grenzen zu halten, wird der fertige Veronalpuffer mit 0,1% Gelatine versetzt.

c) Schafblut wird im gleichen Volumen steriler Alsever-Lösung in der Modifikation von Bukantz, Rein u. Kent aufgefangen und bei 2–5° C zum Stabilisieren der Zellen 4 Tage lang vor Gebrauch aufbewahrt. Die Erythrocyten werden dann in der üblichen Weise aus dem Gesamtblut gewonnen und eine 2%ige Suspension hergestellt.

9. Neutralisationstest (NT)

Es wurde das Prinzip der Technik von Wittmann u. Mayr[47] unter Berücksichtigung der von Munz u. Mahnel[30] mitgeteilten Erfahrungen mit Gewebekulturen angewendet. Dabei handelt es sich um virusneutrali-

sierende Ansätze, in denen das unverdünnte Serum konstant gehalten wird, während die Virusmengen in Verdünnungen abgestuft werden.

Technik. Nach dem Ergebnis der Titration wird das Antigen mit TCM 199 (siehe Kapitel Gewebekultur) so verdünnt, daß die Suspension 1000 Viruseinheiten/0,1 ml enthält. Von dieser Ausgangsverdünnung (2°-Wert) werden im Test Verdünnungsreihen in Potenzen von 2 angelegt. Die unverdünnten Immunseren werden 30 min bei 56° C inaktiviert und dann zu gleichen Teilen mit den in Frage kommenden Virusverdünnungen vereinigt. Die Reagenten läßt man 60 min bei 37° C, nach gutem Durchmischen, im Brutschrank neutralisieren. In gleicher Weise wird mit den Normalserum-Virusgemischen verfahren. Anschließend werden die Gemische jeder Verdünnung in Mengen von je 0,1 ml auf HeLa-Zellkulturen verimpft. Es sind nur solche Röhrchen brauchbar, die einen lückenlosen und einschichtigen Zellrasen aufweisen (Kontrolle im Mikroskop!), da sonst die Ablesung des CPE ungenau wird. Um die Beurteilung auf eine ausreichende statistische Basis zu bringen, verwendet man pro Virusverdünnung mindestens 5—10 Röhrchen und errechnet aus deren mehr oder weniger übereinstimmenden Ergebnissen einen Mittelwert nach der 50%-Methode von REED u. MUENCH[37]. Die Differenz zwischen dem Titer-Logarithmus des Normalserum-Virusgemisches und dem des Neutralisationsgemisches ergibt den Neutralisationsindex (NI), der sich auf 0,1 ml Virusserumgemisch bezieht. Für die Zeitdauer des Tests wird das Anzuchtmedium in den Röhrchen durch 0,9 ml Erhaltungsmedium (siehe Kapitel Gewebekultur) ersetzt. Die beimpften Kulturen werden 3—5 Tage bei 37° C bebrütet und die Reaktion sowie der Zustand der Zellen täglich kontrolliert. Am 3. Tag wird abgelesen. Der CPE ist größtenteils bereits makroskopisch zu erkennen. Zweifelhafte Reaktionen werden mikroskopisch geklärt oder bis zur Kontrollablesung am 5. Tag weiterbebrütet. Röhrchen, die am 5. Tag keinen CPE zeigen, werden als negativ bewertet.

An Kontrollen laufen im Neutralisationstest mit:

Normalserumkontrolle
Viruskontrolle
Normalserum-Kulturkontrolle
Immunserum-Kulturkontrolle
Verdünnungsflüssigkeit-Kulturkontrolle
Normalkulturkontrolle.

B. Ergebnisse

1. Antikörperbildung bei der Vaccineinfektion des Rindes nach cutaner Flächenimpfung

Im Ablauf 1 Jahres wurden fünf Rinder im Alter zwischen 1 und 2 Jahren zu Untersuchungen innerhalb einer 6—7 Wochen dauernden Beobachtungszeit herangezogen. Die Impftiere wurden im Rahmen der Pockenimpfstoffgewinnung in der beschriebenen Weise mit dem Dermovaccinestamm CVB infiziert. Die Infektion verlief als akute, fieberhafte Erkrankung unter Ausbildung eines charakteristischen Exanthems und zeigte bei den einzelnen Tieren nur geringfügige individuelle Abweichungen. Das Pockenexanthem blieb auf das Impffeld begrenzt. Eine Generalisierung des Virus wurde nicht beobachtet.

Nach einer Inkubationszeit von 2—3 Tagen entwickelten sich dichtstehende, hochrote Papeln auf dem flächenhaft geröteten und sich von der Umgebung beet-

artig abhebenden Impffeld (Stad. papulosum). Am 4. Tag zeigten die größer werdenden Knötchen (4—6 mm) eine bläschenartige Kuppe und verfärbten sich gelblich (Stad. vesiculosum). In der Folge gingen sie rasch in eine meist konfluierende Pustelfläche über (Stad. pustulosum). Stellenweise, besonders am Rande des Impffeldes, konnte man die Entwicklung von Einzeleffloreszenzen verfolgen. Sie führte vom Stad. maculosum zur typischen Pockenpustel mit zentraler Eindellung (Pockennabel). Seit dem Stad. papulosum waren die Effloreszenzen von einem schmalen hyperämischen Saum, der Area, umgeben. Am 5.—6. Tag hatten die reifen Pusteln einen Durchmesser von 8—9 mm und eine Höhe von 2—4 mm. Vom Zentrum ausgehend trockneten sie anschließend zu Krusten ein (Stad. crustosum). Der Abfall der Krusten erfolgte zwischen dem 14. und 20. Tag.

Zur Gewinnung des Pockenimpfstoffes war die konfluierende Pusteldecke am 5. Tag p.i. mit einem Schleifenmesser abgeschabt worden. Diese Maßnahme verursachte — im Gegensatz zur Scarifikation bei der Impfung — flächenhafte, tief in das Corium reichende Hautläsionen. Die Folge waren verbreitete Capillarblutungen und eine über das ganze Impffeld ausgedehnte, entzündliche Exsudation. Die Abheilung der großen Wundflächen wurde in zwei Fällen durch bakterielle Superinfektionen erschwert, die bei dem geschwächten Gesamtzustand der Tiere eine ernste Komplikation darstellten.

Der Allgemeinzustand der Impftiere war nach der Flächenimpfung erheblich gestört. Die Entwicklung des Pockenausschlages war von einem deutlich ausgeprägten Fieberstadium mit Höchstwerten um 41,5° C begleitet. In dieser Zeit sistierte die Futteraufnahme fast völlig, und die Tiere erlitten innerhalb von 1 Woche Gewichtsverluste von durchschnittlich 10—15 kg. In der 3. Woche sanken die Temperaturen allmählich auf Normalwerte ab, und im weiteren Verlauf besserte sich das Allgemeinbefinden der Tiere bei guter Futteraufnahme rasch. War indessen eine unspezifische Sekundärinfektion eingetreten, so schwankten die Temperaturen weiterhin zwischen 40 und 41° C. Die Rekonvaleszenz war in diesen Fällen am Ende der Versuchsdauer noch nicht abgeschlossen. Die Tiere kamen sofort zur Schlachtung.

Bei allen Tieren dieser Untersuchungsgruppe wurden im Verlauf der Infektion *virusneutralisierende Serumantikörper* ausgebildet. Sie erschienen vereinzelt zwischen dem 8. und 9. Tag p.i. erstmals in der Blutbahn. Am 10. Tag reagierten alle Tiere positiv. Die Neutralisationsindices stiegen innerhalb der nächsten 14 Tage rasch an und erreichten bei einzelnen Tieren Spitzen zwischen 9,5 und 9,7. Die Mittelwerte fielen anschließend nur geringfügig ab und blieben bis zum Ende der Beobachtungszeit von 6—7 Wochen mit Indices um 8,0 relativ hoch.

Die *hämagglutinationshemmenden Antikörper* traten gegenüber den neutralisierenden Antikörpern zeitlich zwar etwas später im Serum auf, wurden aber ebenfalls regelmäßig gebildet. Bei vier Rindern waren sie erstmals am 10. Tag p.i., bei einem am 11. Tag nachweisbar. Es folgte ein steiler Anstieg der Titerwerte. Am 16. Tag hatten zwei Seren einen maximalen Hemmungswert von 1:8192; die Mittelwerte lagen bei 1:3890. Nach der 3. Woche sanken die Titer allmählich ab und persistierten dann über längere Zeit. Nach 6—7 Wochen p.i. wiesen sie noch Mittelwerte um 1:700 auf.

Die HAH-Antikörper erschienen im Durchschnitt um 2 Tage später in der Blutbahn als die neutralisierenden Antikörper, erreichten aber ihre

Höchstwerte bereits am 16. Tag p.i. Zu dieser Zeit war die Menge der neutralisierenden Antikörper noch im Ansteigen begriffen. Sie wurde aber selbst in den Höchstwerten von den hohen Serumkonzentrationen der HAH-Antikörper weit übertroffen. Im weiteren Verlauf änderte sich dieses Verhältnis langsam zugunsten der neutralisierenden Antikörper. Die hohen HAH-Titer sanken rascher ab als die NT-Indices. Dieses Verhalten weist auf eine längere Verweildauer der neutralisierenden Antikörper hin. Trotzdem war der Verlauf der Titerkurven bei beiden Anti-

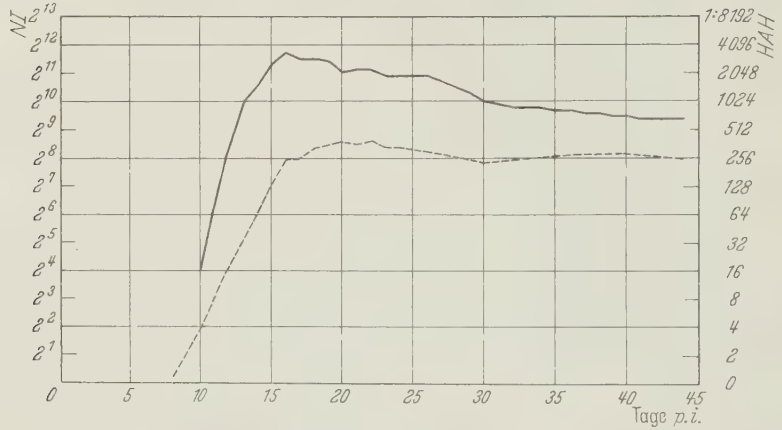


Abb. 1. Bildung hämagglutinationshemmender und neutralisierender Antikörper bei der Vaccineinfektion des Rindes nach cutaner Flächenimpfung. HAH-Antikörper ——; neutralis. Antikörper - - - -

körperarten im wesentlichen etwa gleich. Gipfelbildung und langsames Absinken kamen deutlich zum Ausdruck.

Die Bildung der HAH- und neutralisierenden Antikörper ist in der Abb. 1 graphisch dargestellt.

Komplementbindende Antikörper konnten nach den beschriebenen Methoden in keinem der Rinderseren festgestellt werden. Weder in der akuten Erkrankungsphase noch in der Rekonvaleszenz ergaben sich Anhaltspunkte für ihre Entwicklung im Rinderorganismus.

Überraschend war demgegenüber die starke und frühzeitige Bildung der *präcipitierenden Antikörper*. Sie ließen sich bereits zwischen dem 6. und 9. Tag p.i. im Serum nachweisen. Im Agar traten öfters stark positive Reaktionen, zuweilen auch doppelte Präcipitationsbanden auf. Die stark positiven Befunde ließen zwischen dem 19. und 22. Tag p.i. eine gewisse Häufung erkennen. Bei allen untersuchten Rindern reagierten die Seren bis zum Ende der jeweiligen Beobachtungszeit (in zwei Fällen am 49. Tag p.i.) in der Präcipitationsreaktion positiv bis stark positiv.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt.

Tabelle. *Unterschiedlicher Verlauf der Bildung präcipitierender Antikörper bei der Vaccineinfektion des Rindes nach cutaner Flächenimpfung und cutaner Schnittimpfung*

Tage p.i.	Cutane Flächenimpfung						Cutane Schnittimpfung		
	Anzahl der Seren	Rind 1	2	3	4	5	Anzahl der Seren	Rind 1	2
4	1			0			0		
5	5	0	0	0	0	0	2	0	0
6	1				+		0		
7	0						2	0	0
8	3	+	+	+			0		
9	3	+			+	+	0		
10	4	+		+	+	++	2	+	+
11	3		+,+		+	+	0		
12	5	+	+	+	+	+	2	++	+
13	2		+	+			0		
14	3	+	+	+			0		
15	2				+	+	1	+	
16	3	+	+	+			0		
17	2				+	+	0		
18	2		+	+			2	+	+
19	5	+	++	+	+	++	0		
20	2		++	+,+			0		
21	4		++	+	+	+	0		
22	3	++	+,+	+			1		+
23	2		+	+			0		
25	2		++	+			0		
26	2				+	+	2	+	0
29	2		++	++			0		
30	2				+	+,+	0		
32	2		+			++	2	+	0
35	1			++			0		
36	1	+					0		
38	0						2	+	0
39	1			++			0		
40	2				+	++	0		
41	1	+					0		
42	0						2	+	0
43	2	++		++			0		
44	2				+	++,+	0		
45	0						2	+	+
46	2				+	++,+	0		
49	2				+	++	2	+	+

Zeichenerklärung: 0 = negativer, + = positiver, ++ = stark positiver Ausfall der PR

Die Schwankungen bei den einzelnen Tieren der Untersuchungsgruppe dürften innerhalb der Grenzen liegen, die einerseits durch die individuelle Reaktionsintensität im Verlauf der Infektion, andererseits durch die normale Variationsbreite der Methode gegeben sind. Die Streuung der sero-

logischen Einzelergebnisse um die aufgeführten Mittelwerte sei am Beispiel der HAH-Antikörper in Abb. 2 demonstriert.

Zur Sicherung der Spezifität der einzelnen Reaktionen wurde eine Anzahl positiver Seren mit Antigenen verschiedener Wirtsherkunft überprüft. Die Untersuchungen bestätigten die gefundenen Ergebnisse, womit die mögliche Mitwirkung von Normalkomponenten-Antikörpern ausgeschlossen werden konnte.

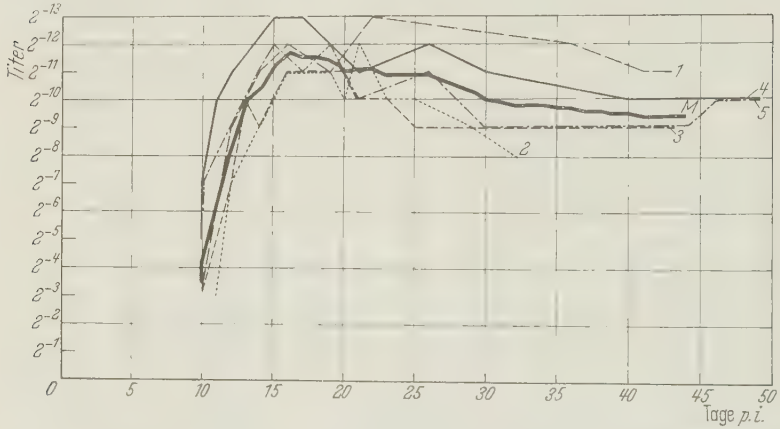


Abb. 2. Überblick über die Streuung der Einzelwerte bei der Bildung hämagglutinationshemmender Antikörper nach der cutanen Flächenimpfung beim Rind

In allen Versuchen wurden auch Rindernormalseren geprüft. Sie reagierten durchwegs negativ.

Eine Verlängerung der Beobachtungszeit der einzelnen Tiere war aus technischen Gründen nicht möglich. Die endgültige Verweildauer der verschiedenen Antikörperqualitäten konnte daher nicht festgestellt werden.

2. Antikörperbildung bei der Vaccineinfektion des Rindes nach cutaner Schnittimpfung

Zwei Jungrinder (1—2 Jahre alt) wurden in der erwähnten Weise mit dem Dermovaccinestamm CVB infiziert. Es entwickelte sich ein milder Krankheitsverlauf. Das Pockenexanthem trat nur an den Impfschnitten auf. Eine Generalisation des Virus wurde nicht beobachtet. Die minimale Belastung der Tiere durch die Schnittimpfung stand im Einklang mit der geringen Ausdehnung des Impffeldes und damit der niedrigen Infektionsdosis.

Entlang der Impfschnitte entstanden vom 3. Tag an typische Vaccineefflorescenzen, die in der Regel einzeln standen. Hauptsächlich an den Kreuzungspunkten der gitterartig angebrachten Impfschnitte kam es auch öfters zum Konfluieren der

Pusteln. Der zeitliche Ablauf der Hautreaktion, das Durchlaufen der einzelnen Stadien der Efflorescenzen sowie deren Abmessungen entsprachen genau der obigen Beschreibung der Einzelefflorescenzen bei der Flächenimpfung. Da die Tiere nicht der Impfstoffgewinnung dienten, war eine Abnahme der reifen Pusteln nicht erforderlich. Bakterielle Sekundärinfektionen stellten sich nicht ein, so daß die Haut des Impffeldes ungestört abheilen konnte. Der Abfall der Borken begann am 15. Tag p.i. und war am 18. Tag abgeschlossen. Der Verlauf der Erkrankung führte zu keiner wesentlichen Störung des Allgemeinbefindens. In der akuten Phase zeigte sich eine nur mäßige Temperaturerhöhung, deren Höchstwerte am 4. Tag p.i. um 40° C lagen. In dieser Zeit war die Futteraufnahme reduziert. Am 10. Tag wurde bereits wieder eine Rectaltemperatur von 38,9° C gemessen.

Bei den beiden Tieren dieser Gruppe waren *neutralisierende Antikörper* ab dem 10. Tag p.i. im Serum nachweisbar. Die NT-Indices stiegen in der Folge relativ langsam an und erreichten am 18. Tag p.i. bei einem

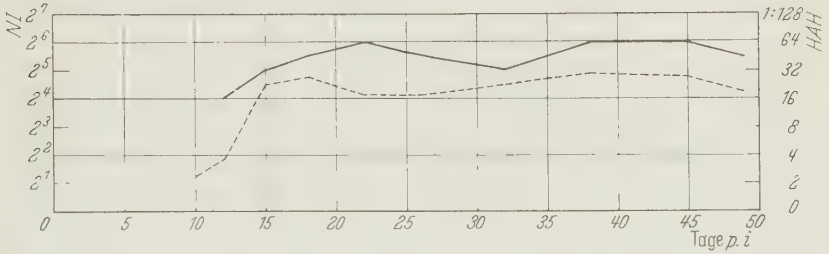


Abb. 3. Bildung hämagglutinationshemmender und neutralisierender Antikörper bei der Vaccineinfektion des Rindes nach cutaner Schnittimpfung. HAH-Antikörper ——: neutralis. Antikörper - - - -

Tier Werte um 5,7, bei dem anderen um 4,2. Von geringfügigen Schwankungen abgesehen, blieben diese Werte bis kurz vor Versuchsende erhalten. Erst in der 7. Woche p.i. ließ sich ein leichter Abfall feststellen.

Die leicht verzögerte und relativ geringe Antikörperstimulierung nach der im Vergleich zur Flächenimpfung sehr schwachen Schnittimpfung war auch bei der Bildung der *hämagglutinationshemmenden Antikörper* zu erkennen. Bezogen auf die neutralisierenden Antikörper erschienen die HAH-Antikörper wieder etwas später in der Blutbahn.

Signifikante Serumtiter traten erst ab dem 12. Tag p.i. auf. Sie bewegten sich zwar weit unter den hohen Werten der anderen Tiergruppe, jedoch blieb der erreichte Titer im wesentlichen erhalten. Erst am 45. Tag begannen die Mittelwerte leicht abzusinken.

Einen Überblick über die Bildung der neutralisierenden- und HAH-Antikörper nach der Schnittimpfung vermittelt die Abb. 3.

Der Nachweis von *komplementbindenden Antikörpern* gelang auch bei dem in dieser Gruppe angewendeten Infektionsmodus in keiner Phase des Infektionsablaufes. Es kamen die beschriebenen Methoden zur Anwendung.

Bei den *präcipitierenden Antikörpern* war eine auffallende Abweichung festzustellen. Sie wurden nicht nur in wesentlich geringerem Maße als bei der Flächenimpfung ausgebildet, sondern verhielten sich auch in bezug auf ihre zeitliche Zuordnung zu den anderen Antikörperarten unterschiedlich. Während die neutralisierenden- und HAH-Antikörper in derselben Reihenfolge im Serum erschienen wie bei der Flächenimpfung, war dies bei den präcipitierenden Antikörpern nicht der Fall. Bei beiden Tieren traten sie ab dem 10. Tag p.i., also gleichzeitig mit den neutralisierenden Antikörpern ,auf. Anschließend konnten sie nur bei einem Tier kontinuierlich bis zum 49. Tag nachgewiesen werden. Die Seren des anderen reagierten zwischen dem 26. und 42. Tag p.i. negativ. Stark positive Reaktionen fehlten fast ganz, was ebenfalls als Ausdruck für die schwache Bildung von präcipitierenden Antikörpern nach der Schnittimpfung gewertet werden muß (siehe Tabelle).

Besprechung der Ergebnisse

Das Antikörperbild des Rindes nach einer experimentellen Vaccineinfektion war durch das regelmäßige Auftreten von neutralisierenden, hämagglutinationshemmenden und präcipitierenden Antikörpern charakterisiert. Dabei spielte es offenbar für die qualitative Ausbildung der einzelnen Antikörperarten keine Rolle, ob eine massive Einverleibung einer großen Anzahl von Viruseinheiten (cutane Flächenimpfung) vorgenommen, oder ob nur eine kleine Infektionsdosis (cutane Schnittimpfung) verwendet wurde. Quantitativ aber, in bezug auf den Erscheinungszeitpunkt im Serum und die Menge der entstehenden Antikörper, entstanden große Unterschiede zwischen den beiden Infektionsmodi. In diesem Zusammenhang war das Verhalten der präcipitierenden Antikörper besonders interessant.

Nach der Flächenimpfung traten die präcipitierenden Antikörper (6.—9. Tag p.i.) vor den neutralisierenden Antikörpern (8. Tag) auf, nach der Schnittimpfung erst gleichzeitig (10. Tag) mit ihnen. Die häufig stark positiv in der PR reagierenden Seren nach der Flächenimpfung sowie ihr kontinuierlicher Antikörpergehalt standen einer einzigen stark positiven und sogar gelegentlich negativen Reaktion der Seren nach der Schnittimpfung gegenüber. Diese Beobachtungen fanden ihre Parallele in dem klinischen Verlauf der Infektion. Die Flächenimpfung führte zu einer heftigen Reaktion des Organismus mit hohem Fieber und einem schweren Krankheitsbild. Im Gegensatz hierzu stand der harmlose Verlauf nach der Schnittimpfung. Die Ursachen für diese unterschiedliche Reaktionsintensität sind sicher komplexer Natur. Man wird aber in der Annahme nicht fehlgehen, daß vor allem zwei, durch den Infektionsmodus variierbare, Vorgänge eine wesentliche Rolle dabei spielen:

1. die Virusvermehrung an der Impfstelle und

2. die unspezifische Alteration der Impfstelle bei der Impfung. Inwieweit dem ersten oder dem zweiten Vorgang bei der Stimulierung der Antikörperbildung ein Übergewicht zukommt, ist möglicherweise für jede Antikörperart typisch. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse sprechen bei den präcipitierenden Antikörpern für ein Überwiegen der Wirkung des Impftraumas. Andererseits ist es denkbar, daß der Rinderorganismus allein auf den spezifisch antigenen Reiz des Vaccinevirus mit einer starken Bildung von präcipitierenden Antikörpern antwortet. Hierzu findet sich bisher nur beim Schwein eine Parallele. Im Serum von vaccineinfizierten Schweinen konnte MAYR[26] einen hohen Gehalt von präcipitierenden Antikörpern feststellen, der sich, langsam abnehmend, bis zum 105. Tag p.i. nachweisen ließ. Es ist bemerkenswert, daß bei diesen Versuchen neben der i.v. Infektion die cutane Flächenimpfung zur Anwendung kam.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit standen für die cutane Schnittimpfung nur zwei Rinder zur Verfügung. Zur Sicherung der gewonnenen Ergebnisse in der PR sind daher noch umfangreichere Untersuchungen an einem größeren Tierkollektiv vorzunehmen.

Theoretisch kann vielleicht eine Beziehung zu den Überlegungen GÜNTHERS[14] hergestellt werden, der sich mit der qualitativen Entstehung der Antikörper beschäftigt und eine sogenannte Fließbandhypothese entwickelt hat. In experimentellen Stoffwechseluntersuchungen kam er zu der Auffassung, daß die Geschwindigkeit des Globulinstoffwechsels — dessen Stoffwechseldruck — bei der Entstehung bzw. Freigabe und bei der gleichzeitigen spezifischen Ausprägung der Antikörper der entscheidende Faktor ist. Es kann als sicher gelten, daß die Flächenimpfung einen stärkeren allgemeinen Stoffwechseldruck verursacht als die Schnittimpfung. Die Fließbandhypothese könnte also auch für quantitative Veränderungen der Antikörperbildung zur Erklärung mit herangezogen werden.

Die festgestellten Abweichungen in der Antikörperbildung nach Verwendung verschiedener Infektionsmodi passen ebenso zu den Vorstellungen PRIGGES[35], der annimmt, daß die Immunitätsreaktionen eines Organismus nicht dem „Alles-oder-Nichts-Gesetz" folgen. Sie sind vielmehr den Verhältnissen individueller Dosis-Wirkungskurven angepaßt (siehe auch Streubreite der HAH, Abb. 2). Dies wurde auch an den anderen Antikörperarten deutlich.

Nach der Flächenimpfung erschienen die neutralisierenden Antikörper am 8. Tag p.i., nach der Schnittimpfung erst am 10. Tag. Eine ähnliche Verzögerung zeigte sich bei der Bildung der HAH-Antikörper. Ferner war nach der Schnittimpfung der Verlauf der Titerkurven deutlich protrahiert. Es wurden niedrigere Höchstwerte und diese später erreicht. Ausgeprägte Titerspitzen fehlten.

Die Menge der neutralisierenden Antikörper war nur nach der Flächenimpfung relativ hoch. Die NT-Indices bewegten sich zwischen 8,0 und 8,5. Vereinzelt traten Spitzenwerte von 9,5 und 9,7 auf, was einer Neutralisationskraft der Immunseren von nahezu 1000 Viruseinheiten/0,1 ml Virusserumgemisch entsprach. Bei der Schnittimpfung lagen die Werte wesentlich niedriger. Hier ähnelten die Befunde etwa denen, wie man sie beim Menschen und anderen vaccineinfizierten Organismen findet. BERGER u. PUNTIGAM[5], die neutralisierende Antikörper ab dem 8. Tag p.i. im Rinderserum fanden, verwendeten im NT eine andere Technik, so daß ihre Ergebnisse mengenmäßig hier nicht vergleichbar sind. MCCARTHY u. Mitarb.[28], WITTMANN u. MAYR[47], HERRLICH, MAYR u. EPP[18] haben auf die niedrigen Neutralisationswerte der Pockenseren gegenüber anderen Virusinfektionen hingewiesen. Sie diskutierten die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen der schlechten Ausschleusung der neugebildeten Viruspartikeln aus der Zelle und der Bildung von intraplasmatischen Einschlußkörperchen als Ursache für eine schwache Stimulierung der Antikörperbildung. Die Vaccineinfektion des Rindes verhielt sich also in dieser Hinsicht etwa gleich.

Die HAH-Antikörper erschienen mit dem 10. Tag p.i. (bzw. 12. Tag) später als bei Kaninchen und Rhesusaffen (HERRLICH, MAYR u. MUNZ[18]), hatten aber mit diesen die hohen Titerwerte und den Kurvenverlauf gemeinsam. Aus der Literatur ist ersichtlich, daß die Verweildauer der HAH- und neutralisierenden Antikörper in Vaccineimmunseren ganz erheblich ist. Am längsten persistieren in der Regel die neutralisierenden Antikörper. Der Verlauf der Titerkurven nach den hier getesteten Rinderseren erlaubt den Schluß, daß diese Angaben auch für das Rind gelten.

Obwohl HERRLICH, MAYR, MAHNEL u. MUNZ[19,26] nach der ersten vorstehend beschriebenen KBR-Technik mit Seren vaccineinfizierter Kaninchen und Rhesusaffen positive Ergebnisse erhielten, lieferten die in dieser Arbeit durchgeführten KB-Reaktionen ausschließlich negative Befunde.

Der Nachweis von KB-Antikörpern im Rinderserum hat schon früher und auch bei anderen Viruserkrankungen Schwierigkeiten bereitet. Es wird dies auf gewisse Hemmsubstanzen des Rinderserums zurückgeführt, die man durch verschiedene technische und biologische Manipulationen zu umgehen suchte. MARUCCI[27] sowie KORN u. TRUSZCZYNSKI[22] gelang es in jüngster Zeit, bei der Maul- und Klauenseuche in Rinderseren KB-Antikörper direkt nachzuweisen. Bei der Infektion mit dem Virus der Stomatitis vesicularis berichteten BOULANGER u. BANNISTER[8] von positiven Resultaten in der KBR mit Rinderseren. Der Erfolg dieser Untersuchungen dürfte weitgehend von der genauen Einstellung der Gebrauchsdosen von Erythrocyten und Komplement beeinflußt worden sein. Die Autoren bedienten sich zur Bestimmung der Hämolysegrade und der Dichte der Erythrocytensuspensionen optischer Meßgeräte. Diese Mög-

lichkeit war bei der vorliegenden Arbeit nicht gegeben. Die negativen Ergebnisse haben somit nur eine geringe Aussagekraft. Es kann erst nach weiteren und genaueren Untersuchungen diskutiert werden, ob in dem möglichen Fehlen der KB-Antikörper im Rinderserum eine Eigenart seines Antikörperbildes erblickt werden kann.

Nach dem bisherigen Wissen werden im Verlaufe jeder Vaccineinfektion in empfänglichen Organismen virusneutralisierende Antikörper gebildet. Man sieht sie als Grundlage der humoralen Komponente der Immunität an. Bei den HAH-Antikörpern konnten bisher keine sicheren Anhaltspunkte für eine Beziehung zur Immunität gefunden werden. Sie erscheinen zwar fast regelmäßig im Serum vaccineinfizierter Menschen und Tiere, es traten aber doch vereinzelt Fälle auf, bei denen sie trotz vorhandener Immunität nicht nachzuweisen waren.

Die Bildung der anderen Antikörperarten scheint bei den einzelnen Organismen stärkeren Schwankungen unterworfen zu sein.

So wurden KB- und präcipitierende Antikörper beim Menschen bisher nur vereinzelt festgestellt, beim Rinde fehlen erstere anscheinend ganz. Präcipitierende Antikörper werden dagegen gut gebildet. Es ist aber zu bedenken, daß in der menschlichen Pockenschutzimpfung nur eine relativ geringe Infektionsdosis zur Anwendung kommt. Rohde, Schneeweiss u. Kühn[38] sind der Meinung, daß es zur Entwicklung von KB-Antikörpern beim geimpften Menschen einer länger dauernden Virämie, mithin also einer stärkeren Virusvermehrung, bedarf.

Sollten auch beim Rind KB-Antikörper gefunden werden, würde sich sein Antikörperbild von dem anderer Tiere und des Menschen nur mehr unwesentlich unterscheiden. Es ergeben sich demnach sowohl aus den hier gemachten Erfahrungen wie aus der bisherigen Literatur kaum Anhaltspunkte dafür, daß jedem Wirtsorganismus nach der experimentellen Vaccineinfektion ein für ihn qulitativ typisches Antikörperbild zukommt. Die quantitativen Unterschiede sind aber für eine Differenzierung zum Teil zu unerheblich oder noch von Schwächen der Methoden belastet.

Die Frage der Eigenständigkeit der verschiedenen Antikörperarten ist hingegen auch nach den Untersuchungen in dieser Arbeit positiv zu beantworten. Dafür sprechen sowohl die unterschiedliche Erscheinungsfolge der verschiedenen Antikörper in der Blutbahn als auch ihre wechselnden Mengenverhältnisse.

Zusammenfassung

Nach einer experimentellen Infektion mit dem Vaccinevirus bildete der Rinderorganismus regelmäßig neutralisierende, hämagglutinationshemmende und präcipitierende Serumantikörper aus. Komplementbindende Antikörper konnten mit den beschriebenen Methoden nicht nachgewiesen werden.

Durch die Anwendung zweier verschiedener Infektionsmodi wurde eine unterschiedliche Antikörperbildung hervorgerufen.

Nach cutaner Flächenimpfung erfolgte eine starke und frühzeitige Stimulierung der antikörperbildenden Zellsysteme. Die Bildung der präcipitierenden Antikörper war dabei in besonderer Weise angesprochen, denn sie ließen sich bereits zwischen dem 6. und 9. Tag p.i. in der Blutbahn nachweisen und verweilten dort bis zum 49. Tag in signifikanten Mengen. Es folgten die neutralisierenden Antikörper am 8. Tag p.i., die HAH-Antikörper traten am 10. Tag erstmals im Serum auf. Die HAH-Titer erreichten die höchsten Werte, sanken dann aber rascher ab als die neutralisierenden Antikörper.

Nach cutaner Schnittimpfung wurde die Antikörperbildung schwächer angeregt und setzte verzögert ein. Die präcipitierenden Antikörper erschienen nicht mehr vor, sondern gleichzeitig mit den neutralisierenden Antikörpern am 10. Tag p.i. Die HAH-Antikörper waren, wie nach der Flächenimpfung, erst 2 Tage nach dem ersten Auftreten der neutralisierenden Antikörper erfaßbar und hatten die höchsten Titer.

Ursachen für das auffallende Verhalten der präcipitierenden Antikörper nach den verschiedenen Infektionsmodi werden diskutiert.

Die einzelnen Antikörperarten persistierten bis zum 49. Tag p.i. mit relativ hohen Werten.

Herrn Prof. Dr. A. HERRLICH, Bayerische Landesimpfanstalt, München und Herrn Prof. Dr. A. MAYR, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, bin ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Literatur

[1] ANDREWES, C. H.: The action of immune serum on vaccinia and Virus III in vitro J. Path. Bact. **31**, 671 (1928).

[2] BÉCLÈRE, CHAMBON et MÉNARD: zit. bei HALLAUER, C., u. FL. MAGRASSI. In: Hdb. d. Virusforsch., Bd. II, von Doerr u. Hallauer. Berlin: Springer 1939.

[3] BEDSON, S. P.: Observations on the mode of action of a viricidal serum. Brit. J. exp. Path. **9**, 235 (1928).

[4] BERGER, K.: Kuhpockenvirus und Vaccinevirus. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **143**, 151 (1956).

[5] BERGER, K., u. F. PUNTIGAM: Untersuchungen über die Veränderungen des weißen Blutbildes und der Bluteiweißkörper sowie über die Antikörperbildung nach cutaner, subcutaner und intracutaner Einverleibung von Pockenschutzimpfstoff. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **138**, 272 (1953).

[6] BERGER, K., u. F. PUNTIGAM: Experimentelle Kuhpockeninfektion beim Rind. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **172**, 363 (1958).

[7] BINGEL, K. F., u. FR. KRUSE: Methoden und Ergebnisse der virologischen und serologischen Untersuchungen bei den Pockenerkrankungen in Heidelberg (Dez. 1958/Jan. 1959). Medizinische **20**, 961 (1959).

[8] BOULANGER, P., and G. L. BANNISTER: A modified direct Complement Fixation Test for the detection of antibodies in the serum of cattle previously infected with Vesicular Stomatitis Virus. J. Immunol. **85**, 368 (1960).

[9] Collier, W. A.: Investigations into the inhibition of vaccinia haemagglutination by sera from individ. vacc. against smallpox. Med. Maandblad **1949**, 230.

[10] Collier, W. A.: Individual Immunity against smallpox. Docum. neerl. indones. Morb. trop. **3/2**, 163 (1951); ref. in Excerpta med. (Amst.), Sect. VI, **1952**, 7416.

[11] Dulbecco, R.: Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **38**, 747 (1952).

[12] Freyer, M.: Das Immunserum der Kuhpockenlymphe. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **36**, 272 (1904).

[13] Gastinel, P.: Des réactions d'infection et d'immunité dans la vaccine et la variola. Paris: G. Steinheil 1913; zit. bei Sobernheim, G.: In: Hdb. d. Pockenbekämpfung und Impfung, von Lentz u. Gins. Berlin: Schoetz 1927.

[14] Günther, O.: Die Entstehung der Antikörper. Dtsch. med. Wschr. **44**, 2107 (1961).

[15] Heller, O., u. E. Tomarkin: Ist die Methode der Komplementbindung beim Nachweis spezifischer Stoffe für Hundswut und Vaccine brauchbar. Dtsch. med. Wschr. **1907**, 795.

[16] Herrlich, A., u. A. Mayr: Vergleichende experimentelle Arbeiten über die Vaccine-Kuhpocken-Viren. Arch. Hyg. (Berl.) **138**, 479 (1954).

[17] Herrlich, A., u. A. Mayr: Die Differenzierung der Tierpockenviren im bebrüteten Hühnerei. Arch. Hyg. (Berl.) **139**, 444 (1955).

[18] Herrlich, A., A. Mayr u. Ch. Epp: Über das Antikörperbild des Menschen bei normalem und gestörtem Verlauf einer Pockenschutzimpfung. Arch. Hyg. (Berl.) **145**, 256 (1961).

[19] Herrlich, A., A. Mayr u. E. Munz: Das Antikörperbild der Variola-Vaccine-infektion. — 1. Mitt.: Unterschiedliche Antikörperentwicklung bei der Vaccineinfektion des Kaninchens, Affen und Menschen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **166**, 73 (1956).

[20] Hirst, G. K.: The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryo infected with influenza virus. Science **94**, 22 (1941).

[21] Jobling, J. W.: The occurence of specific immunity principles in the blood of vaccinated calves. J. exp. Med. **8**, 707 (1906).

[22] Korn, G., u. M. Truszczynski: Nachweis komplementbindender Antikörper nach Marucci in den Seren experimentell MKS-durchseuchter Rinder und Schweine sowie hyperimmunisierter und vakzinierter Rinder. Arch. exp. Vet. Med. **13**, 103 (1959).

[23] Löffler, F. A. J.: zit. bei Gins, H. A.: Immunbiologie und Schutzimpfungen. In: Hdb. d. Viruskrankh., von Gildemeister, Haagen u. Waldmann. Jena: Fischer 1939.

[24] Mayr, A.: Experimentelle Arbeiten über das hämagglutinierende Prinzip bei den Tierpockenviren. Arch. ges. Virusforsch. **6**, 439 (1955).

[25] Mayr, A.: Experimentelle Untersuchungen über das Virus der originären Schweinepocken. Arch. ges. Virusforsch. **9**, 156 (1959).

[26] Mayr, A., A. Herrlich u. H. Mahnel: Experimentelle Untersuchungen über das S-Antigen bei den Tierpockenviren. Arch. Hyg. (Berl.) **139**, 580 (1955).

[27] Marucci, A. A.: Direct complement fixation for detection of foot and mouth disease antibody in sera from experimentally infected cattle. Amer. J. vet. Res. **18**, 785 (1957).

[28] McCarthy, K., A. W. Downie and W. H. Bradley: The antibody response in man following infection with viruses of the pox group. — II. Antibody response following vaccination. III. Antibody response in smallpox. J. Hyg. (Lond.) **56**, 466 (1958).

[29] Morgan, J. F., H. J. Morton and R. C. Parker: Nutrition of animal cells in tissue culture. — Initial studies on a synthetic medium. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **73**, 1 (1950).

[30] Munz, E., u. H. Mahnel: Möglichkeiten des Neutralisationstests mit Vaccine- und Variolaseren in Gewebekulturen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **180**, 150 (1960).

[31] Nagler, F. P.: Application of Hirst-Phenomenon to the titration of vaccine virus and vaccine immune serum. Med. J. Aust. **1**, 281 (1942).

[32] Oudin, J.: Méthode d'analyse immunochimique par précipitation specifique en milieu gélifié. C. R. Acad. Sci. (Paris) **222**, 115 (1946).

[33] Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels. Acta path. microbiol. scand. **25**, 186 (1948).

[34] Paschen, E.: Zur Ätiologie der Variola und Vaccine. Dtsch. med. Wschr. **1913**, 2132.

[35] Prigge, R.: Individual- und Kollektiv-Gesetz der Wirkung von Antigenen, Giften und Chemotherapeutica. Arzneimittel-Forsch. **6**, 1 (1956).

[36] Raynaud, G.: C. R. Acad. Sci. (Paris) **84** (1877); zit. bei Sobernheim, G.: Immunitätsverhältnisse bei Menschen- und Tierpocken. In: Hdb. d. Pockenbekämpfung und Impfung, von Lentz und Gins. Berlin: Schoetz 1927.

[37] Reed, L. J., and H. Muench: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Amer. J. Hyg. **27**, 493 (1938).

[38] Rohde, W., U. Schneeweiss, u. O. Kühn: Komplementbindende Vakzine-Antikörper vor und nach Pocken-Schutzimpfungen. Münch. med. Wschr. **46**, 2279 (1960).

[39] Scherer, W. F., J. T. Syverton and G. O. Gey: Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. — IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa). J. exp. Med. **97**, 695 (1953).

[40] Siegert, R., H. G. Haussmann u. L. Hertenstein: Komplementbindungsreaktion zur Influenzadiagnostik. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **139**, 69 (1954).

[41] Sternberg, G.: Trans. Ass. Amer. Physic. **1892**, 98; zit. bei Hallauer, C.: Die erworbene Virusimmunität. In: Hdb. d. Virusforsch. von Doerr und Hallauer, Bd. II. Wien: Springer 1939.

[42] Straus, Chambon et Ménard: Sem. méd. 1890; zit bei Sobernheim, G.: Immunitätsverhältnisse bei Menschen- und Tierpocken. In: Hdb. d. Pockenbekämpfung und Impfung, von Lentz und Gins. Berlin: Schoetz 1927.

[43] Szathmáry, J., u. S. Holik: Übertragung der hämagglutinationshemmenden Antikörper pockengeimpfter Mütter auf die Neugeborenen. Z. Immun.-Forsch. **113**, 411 (1956).

[44] Todd, C.: On a dilution phenomenon observed in the titration of the serum of fowls immunized against the virus of fowl plague. Brit. J. exp. Path. **9**, 244 (1928).

[45] Tomarkin, E., u. P. Suarez: Präzipitation und Thermopräzipitation bei Vaccine. Z. Immun.-Forsch. **26** (1917).

[46] Wittmann, G.: Der Nachweis präzipitierender Antikörper bei der Hühnerpockeninfektion mit Hilfe des Agar-Diffusionsverfahrens. Zbl. Vet. Med. **5**, 769 (1958).

[47] Wittmann, G., u. A. Mayr: Experimentelle Untersuchungen über die Immunität bei Hühnerpocken unter besonderer Berücksichtigung der Schutzimpfung. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **177**, 518 (1960).

Hans Adldinger,
Bayerische Landesimpfanstalt, 8 München 9, Am Neudeck 1

Zeitschrift f. Hygiene 148, 539—545 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. R. Haas)

Untersuchungen über die Streptokokken-Diphosphopyridinnucleotidase

III. Versuche zur kompetitiven Hemmung der Enzymaktivität

Von
K. F. Petersen*

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Juni 1962)

In zwei vorangegangenen Mitteilungen[4,5] wurde über die Anreicherung einer DPNase aus dem Überstand von Kulturen hämolysierender Streptokokken sowie über Untersuchungen zur Charakterisierung des Enzyms berichtet. In Fortsetzung dieser Untersuchungen wurde zur Klärung der Frage, ob Spaltprodukte des DPN** sowie Strukturanaloge dieser Substanzen eine Hemmung der Enzymaktivität bewirken, eine Reihe von Versuchen durchgeführt. Durch die Arbeiten von McIlwain u. Rodnight[3], deren Ergebnisse in der Folgezeit von vielen anderen Autoren bestätigt werden konnten, wissen wir, daß Gewebs-DPNasen durch Nicotinsäureamid kompetitiv gehemmt werden können. Auch Kaplan, Colowick u. Nason[2] konnten zeigen, daß DPNase aus Rattengehirn durch NSA gehemmt wird. Sie stellten bei einer Konzentration von $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ Mol/l eine Aktivitätseinbuße von 70% fest (dabei war die NSA-Konzentration im Reaktionsmedium zehnfach höher als die des DPN). Demgegenüber wurde die Aktivität der Neurospora-DPNase selbst bei $3{,}3 \cdot 10^{-2}$ Mol/l (66fache Konzentration gegenüber der des DPN) nicht beeinträchtigt.

Carlson u. Mitarb.[1] untersuchten die Wirkung des NSA auf die Streptokokken-DPNase und stellten fest, daß es in Konzentrationen bis $4 \cdot 10^{-2}$ Mol/l unwirksam war; erst bei $1 \cdot 10^{-1}$ Mol/l führte es zu einer Hemmung der Enzymaktivität von 17%. Unter Berücksichtigung der methodischen Angaben der Verfasser bedeutet das, daß NSA noch in 40fach höherer Konzentration gegenüber dem DPN keinen Einfluß auf die Aktivität der Streptokokken-DPNase ausübt und daß selbst eine 100fach höhere Konzentration nur eine geringe Hemmwirkung zeigt.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
** Die angewandten Abkürzungen entsprechen denen der 1. Mitteilung.

Material und Methoden

Präparate. Nicotinsäure (NS, Merck), Nicotinsäureamid (NSA, Merck), Isonicotinsäurehydrazid (INH Neoteben-Bayer), p-Aminosalicylsäure (PAS Pasalon-Bayer), p-Aminobenzoesäure (PAB, Merck).

Diese Substanzen wurden in einer Konzentration von 0,2 Mol/l in Phosphatpuffer (0,1 M; p_H 7,3) gelöst, die Lösungen wurden mit 2 n NaOH auf p_H 7,3 eingestellt. Durch Verdünnung mit dem gleichen Puffer wurden Konzentrationen von 10^{-1}, $5 \cdot 10^{-2}$, 10^{-2}, $5 \cdot 10^{-3}$ und 10^{-3} Mol/l hergestellt.

Ansätze. 1) „Stopp-Test". DPN 16 mg/ml = ca. $2 \cdot 10^{-2}$ M/l 0,05 ml
Prüfsubstanzen $2 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-3}$ M/l 0,1 ml
DPNase (ca. 500 E/ml) 0,1 ml

7,5 min bei 37° C, dann Zugabe von 5,0 ml Glykokoll-Puffer p_H 9,0 (mit Semicarbazid-Alkohol) und DPN-Messung nach der ADH-Methode. Berechnung der DPNase-Aktivität aus der Differenz der DPN-Werte der Ansätze ohne und mit Enzym (siehe 2. Mitteilung[4]).

Da die DPN-Menge im Reaktionsansatz von 0,25 ml etwa 1 μmol entspricht, die der Prüfsubstanzen (NS, NSA usw.) je nach Konzentration 0,1—20 μmol, wird für jede Substanz ein Konzentrationsbereich durchschritten, der vom 0,1fachen bis zum 20fachen der DPN-Konzentration reicht.

2) „Kinetischer Test" (siehe 1. Mitteilung[5])

Im Ansatz befinden sich bei einer Schichtdicke der Cuvette von $d = 1$ cm:

DPN (16 mg/ml) 0,05 ml
ADH (Boehringer, 1:5 verd.) 0,02 ml
Alkohol (40%) 0,1 ml
Phosphatpuffer (0,1 M; p_H 7,3) 2,0 ml

Inkubation bei 37° C, nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes (ca. 7 min) Zugabe von

DPNase (ca. 1000 E/ml) 0,1 ml

Nach weiteren 5 min werden je 0,1 ml der in der beschriebenen Weise gelösten Testsubstanzen zugegeben. Die Extinktionsmessung erfolgt bei 366 nm.

Ergebnisse

Bei den unter Verwendung des „Stopp-Tests" durchgeführten Untersuchungen zeigte es sich, daß die Aktivität der Streptokokken-DPNase durch NS, INH und PAS bis zu Konzentrationen von $8 \cdot 10^{-2}$ Mol/l nicht gehemmt wurde (das entspricht dem 20fachen der eingesetzten DPN-Konzentration). Vielmehr führten überraschenderweise der Zusatz von NS, in geringerem Maße auch von INH, zu einem mit steigender Konzentration zunehmenden Anstieg der Enzymaktivität, für den eine Erklärung vorerst nicht gegeben werden kann. Bei PAB war eine geringe Abnahme der DPNase-Aktivität nachweisbar; sie trat jedoch erst bei einer Konzentration von $8 \cdot 10^{-2}$ in Erscheinung und betrug nur etwa 7%, so daß sie wohl durch unspezifische Einflüsse bedingt sein könnte.

Anders scheinen die Verhältnisse bei NSA zu liegen (siehe Tabelle, Abb. 1).

Tabelle. *Aktivität der Streptokokken-DPNase in Gegenwart von $8 \cdot 10^{-2}$ M/l von*

	PAS	PAB	INH	NS	NSA	Kontrolle
Enzymaktivität in %	100	93	106	110	70	100

Immerhin beträgt die Abnahme der DPNase-Aktivität bei einer NSA-Konzentration von $8 \cdot 10^{-2}$ M/l etwa 30%, bei weiterer Steigerung auf $1{,}6 \cdot 10^{-1}$ sinkt die Aktivität auf etwa 54% ihres Ausgangswertes ab.

Diese Ergebnisse entsprechen nicht ganz den von Carlson u. Mitarb.[1] mitgeteilten Befunden, nach denen bei einer NSA-Konzentration von $4 \cdot 10^{-2}$ M/l keine und selbst bei $1 \cdot 10^{-1}$ M/l nur eine Abnahme der

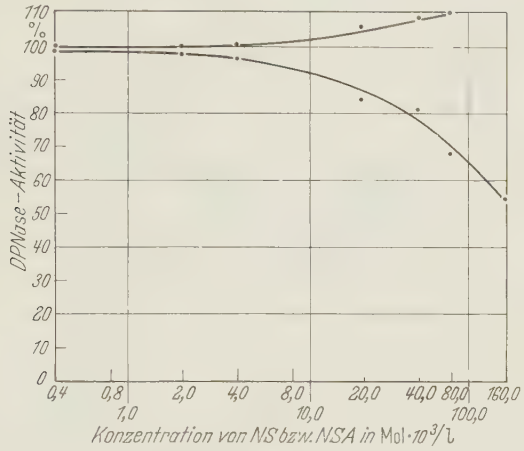


Abb. 1. Darstellung des Einflusses von Nicotinsäure (obere Kurve) und Nicotinsäureamid (untere Kurve) auf die Aktivität der Streptokokken-DPNase

DPNase-Aktivität von etwa 17% beobachtet wurde. Unterschiede der angewandten Methoden dürften als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse ausscheiden, da wir unsere Ergebnisse auch dann reproduzieren konnten, wenn wir die gleichen Mengen- und Konzentrationsverhältnisse anwandten, wie sie von Carlson u. Mitarb. beschrieben worden sind. Auch Unterschiede in der Art der verwendeten Enzympräparate können dafür nicht verantwortlich gemacht werden. Mit einem DPNase-Präparat, welches uns freundlicherweise von Bernheimer zur Verfügung gestellt worden ist und bei dem es sich um das gleiche Präparat handeln dürfte, welches Carlson u. Mitarb. für ihre Untersuchungen verwendet haben, konnten wir ganz ähnliche Hemmwerte ermitteln wie unter Verwendung des eigenen Enzympräparates.

Die unter Verwendung des kinetischen Tests durchgeführten entsprechenden Untersuchungen brachten für die Substanzen NS, PAS und PAB die nach den vorausgegangenen Versuchen erwarteten Ergebnisse (Abb. 2), d.h. die Geschwindigkeit des DPN-Abbaus wurde durch Zugabe dieser Substanzen nicht beeinflußt. Dagegen ließ sich auch durch Zusatz von NSA selbst dann keine Hemmung oder Verlangsamung des DPN-Abbaus erzielen, wenn seine Konzentration im Reaktionsansatz

$1{,}7 \cdot 10^{-2}$ M/l betrug und damit 40fach höher war als die des DPN (Abb. 3). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in Abhängigkeit von der angewandten Methode haben wir bisher nicht gefunden.

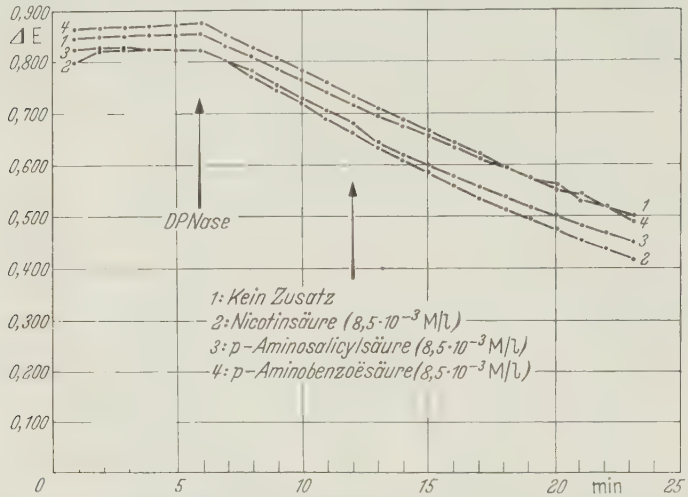


Abb. 2. Einfluß von Nicotinsäure, p-Aminosalicylsäure und p-Aminobenzoesäure auf die Geschwindigkeit des durch die Streptokokken-DPNase katalysierten DPN-Abbaus

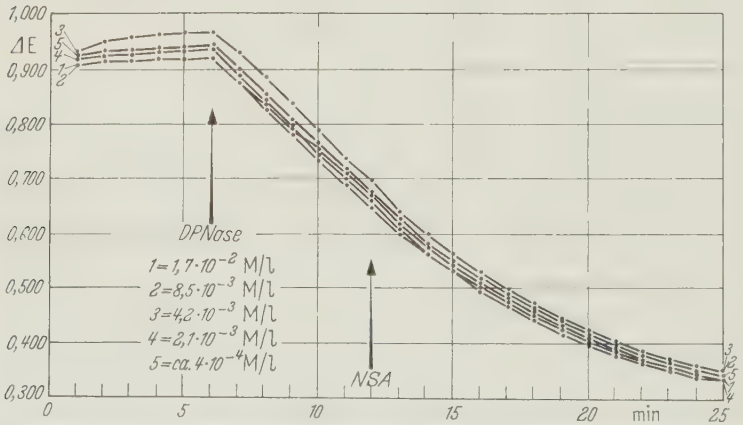


Abb. 3. Einfluß von Nicotinsäureamid auf die Geschwindigkeit des durch die Streptokokken-DPNase katalysierten DPN-Abbaus

Außer dem NSA zeigte auch das INH im kinetischen Test ein gegenüber dem Ergebnis der Versuche unter Verwendung des „Stopp-Tests" abweichendes Verhalten. Wie aus Abb. 4 ersichtlich ist, kommt es nach Zusatz von INH in Konzentrationen, die höher liegen als die des DPN, zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Extinktion. Dabei wird zum Teil der Ausgangswert der Gleichgewichtsreaktion (vor Enzymzugabe) überschritten, so daß die Extinktionszunahme zumindest nicht allein durch eine Hemmung der Enzymaktivität verursacht sein kann.

Eine derartige Annahme ist nach den mit dem „Stopp-Test" ermittelten Ergebnissen auch nicht wahrscheinlich. Es muß vielmehr daran gedacht werden, daß das INH an der Gleichgewichtsreaktion (Alkohol + DPN ⇆ Acetaldehyd + DPNH) direkt angreift. Eine Änderung des Gleichgewichtszustandes kann nur dadurch zu einer Extinktionszunahme führen, daß Aldehyd entfernt wird: die Einstellung auf ein neues Gleichgewicht erfolgt in Gegenwart von ADH durch Oxydation von Alkohol

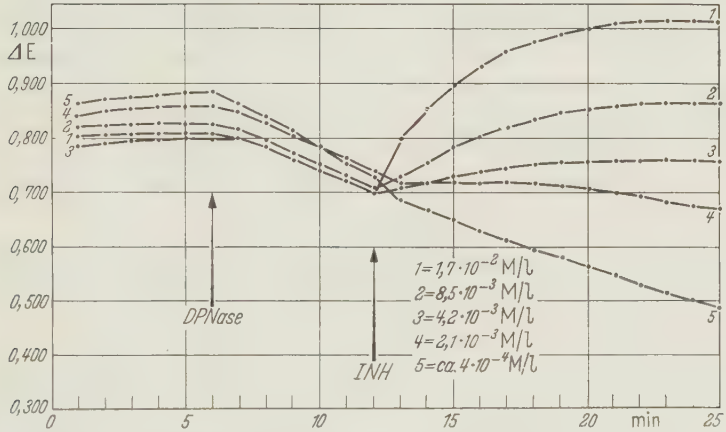
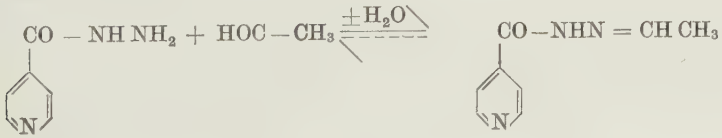


Abb. 4. Einfluß von Isonicotinsäurehydrazid auf die Geschwindigkeit des durch die Streptokokken-DPNase katalysierten DPN-Abbaus

unter gleichzeitiger Reduktion von DPN zu DPNH, so daß ein Extinktionsanstieg resultiert. Dieser Mechanismus liegt dem „Stopp-Test" zugrunde, bei dem als „Aldehydfänger" Semicarbazid verwendet wird. Vergleicht man die Strukturformeln von Semicarbazid und INH,

so erscheint die Annahme eines „Semicarbazid-Effekts" des INH durchaus plausibel. In gleicher Weise wie durch Reaktion mit Semicarbazid das Acetaldehyd-Semicarbazon entsteht, kann man sich eine Bindung des Acetaldehyds an INH unter Bildung von Acetaldehyd-isonicotinsäurehydrazon vorstellen:



Daß tatsächlich das INH an Stelle von Semicarbazid als „Aldehydfänger" im „Stopp-Test" verwendet werden kann, läßt sich experimentell leicht nachweisen. Vermindert man die Alkoholkonzentration in der für die DPN-Bestimmung nach der ADH-Methode verwendeten Glykokollpuffer-Lösung (siehe 2. Mitteilung) so weit, daß die im Reaktionsansatz befindliche DPN-Menge bei Anwesenheit von Semicarbazid gerade noch vollständig reduziert wird, so läßt sich durch Vergleich der Ansätze mit Semicarbazid, mit INH sowie ohne „Aldehydfänger" zeigen, daß unter sonst gleichen Bedingungen die Wirkung des INH der des Semicarbazids entspricht. Ein in der beschriebenen Weise durchgeführter Versuch führte zu den folgenden Werten:

DPN-Bestimmung unter Verwendung von Glykokollpuffer

a) ohne „Aldehydfänger" : $\Delta E = 0{,}256$

b) mit Semicarbazid : $\Delta E = 0{,}603$

c) mit INH : $\Delta E = 0{,}533$

Untersuchungen zur Klärung der Frage, worauf die um etwas mehr als 10% geringere Ausbeute bei der Verwendung von INH als „Aldehydfänger" zurückzuführen ist, wurden nicht angestellt.

Diskussion

Unter der Einwirkung der Streptokokken-DPNase wird, wie von Carlson u. Mitarb.[1] sowie durch eigene Untersuchungen[5] nachgewiesen werden konnte, das DPN-Molekül an der Nicotinsäureamid-Ribose-Bindung gespalten. Es kommt daher bei der durch DPNase katalysierten DPN-Spaltung zu einer Anreicherung des NSA mit zunehmender Reaktionsdauer. Aus diesem Grunde schien es uns von Interesse zu sein, den Einfluß von NSA auf die DPNase-Reaktion zu prüfen. In diese Untersuchungen wurden vier strukturell verwandte Verbindungen mit einbezogen: Nicotinsäure, Isonicotinsäurehydrazid, p-Aminosalicylsäure und p-Aminobenzoesäure.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist insofern interessant, als von den geprüften Substanzen nur NSA eine gewisse Hemmwirkung aufwies. Sie trat allerdings erst bei relativ hohen NSA-Konzentrationen in Erscheinung, so daß es fraglich erscheinen mag, ob es sich dabei um eine kompetitive Hemmung handeln kann. Eindeutige kompetitive Hemmungen sind bei verschiedenen Gewebs-PDNasen mit sehr viel geringeren Konzentrationen von NSA (um 10^{-3} M/l) erzielt worden (McIlwain u. Rodnight[3]; Kaplan, Colowick u. Nason[2]; Scriba, Schneider u. Holzer[6] u. a.). Andererseits konnten Kaplan, Colowick u. Nason selbst bei einer NSA-Konzentration von $3.3 \cdot 10^{-2}$ M/l keine Beeinträchtigung der Aktivität der Neurospora-PDNase feststellen; höhere Konzentrationen wurden von diesen Autoren nicht geprüft.

Man wird die Beeinflussung der DPNase verschiedener Provenienz durch NSA nicht unter qualitativen, sondern vielmehr unter quantitativen Gesichtspunkten betrachten müssen, d. h. daß alle Übergänge von der Hemmung durch niedrige Konzentrationen bis zur fehlenden Beeinflussung selbst durch extrem hohe Konzentrationen möglich zu sein scheinen.

Für die Annahme, daß es sich bei der in unseren Untersuchungen beobachteten Hemmung der Streptokokken-DPNase durch NSA um eine kompetitive Hemmung handelt, lassen sich unseres Erachtens folgende Gründe anführen:

1. In orientierenden Versuchen konnten wir eine Abhängigkeit der Enzymhemmung von der Substrat(DPN)-Konzentration feststellen, d.h. die Enzymaktivität konnte bei gleichbleibendem NSA-Gehalt im Reaktionsmedium durch Erhöhung der DPN-Konzentration gesteigert werden.

2. Dem NSA strukturell verwandte Verbindungen (NS, INH) beeinflussen die Enzymaktivität nicht in dieser Weise. Besonders bemerkenswert erscheint uns an den Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen das unterschiedliche Verhalten von NS und NSA (Abb. 1), da es möglicherweise einen Hinweis auf die Bedeutung der Carbonamid-Gruppe des NSA für die Enzym-Substrat-Bindung gestattet.

Zusammenfassung

Es wurden Untersuchungen über die Einwirkung von Nicotinsäureamid und einiger Strukturanaloga (Nicotinsäure, Isonicotinsäurehydrazid, p-Aminosalicylsäure, p-Aminobenzoesäure) auf die durch die Streptokokken-DPNase katalysierte DPN-Spaltung angestellt. Dabei konnte lediglich durch Nicotinsäureamid eine Hemmung der Enzymaktivität erzielt werden, allerdings erst in Konzentrationen über 10^{-2} Mol/l.

Bei Versuchen unter Verwendung des „kinetischen Tests" ergab sich als Nebenbefund, daß Isonicotinsäurehydrazid in ähnlicher Weise wie Semicarbacid als „Aldehydfänger" (wahrscheinlich unter Bildung von Acetaldehyd-isonicotinsäurehydrazon) fungiert.

Literatur

[1] Carlson, A. S., A. Kellner, A. W. Bernheimer and E. B. Freeman: A streptococcal enzyme that acts specifically upon diphosphopyridine nucleotide: characterization of the enzyme and its separation from streptolysin 0. J. exp. Med. **106**, 15—26 (1957).

[2] Kaplan, N. O., S. P. Colowick and A. Nason: Neurospora diphosphopyridine nucleotidase. J. biol. Chem. **191**, 473—483 (1951).

[3] McIlwain, H., and R. Rodnight: Breakdown of cozymase by a system from nervous tissue. Biochem. J. **44**, 470—477 (1949).

[4] Petersen, K. F.: II. Reaktionskinetische Studien, Entwicklung von Methoden zum Enzym- und Antikörpernachweis. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 357—368 (1961).

[5] Petersen, K. F., H. Kröger u. H. W. Rotthauwe: Untersuchungen über die Streptokokken-Diphosphopyridinnucleotidase. I. Partielle Reinigung und Charakterisierung des Enzyms. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 350—356 (1961).

[6] Scriba, P., S. Schneider u. H. Holzer: Zur Wirkung von 2,5-Dimethoxyaethoxy-3,6-bis-aethylenimino-benzochinon-1,4 (Bayer A 139) auf die Glykolyse von Ascites-Tumrozellen. Z. Krebsforsch. **63**, 547—557 (1960).

Dozent Dr. K. F. Petersen,
Hygiene-Institut der Universität, 78 Freiburg i. Br., Hermann Herder-Straße 11

Zeitschrift f. Hygiene 148, 546—552 (1962)

Aus dem Staatlichen Hygiene-Institut Bremen
Direktor: Prof. Dr. Chr. van Marwyck)
Bakteriologisch-Serologische Abteilung (Dr. B. Warnecke)

Antibiotische Resistenzlage von Salmonella manchester und Behandlungsergebnisse entsprechender Salmonellosen und Keimträger

Von
Bernd Warnecke

(Eingegangen am 6. Juli 1962)

Eine ausgedehnte Salmonella manchester-Epidemie im Raum Bremen bot Gelegenheit zu eingehenden Untersuchungen mit der antibiotischen Resistenzlage dieser Bakterienart. Im Staatlichen Hygiene-Institut Bremen hat sich im Laufe der Jahre für Routineuntersuchungen der Plättchentest bewährt. Er stellt allerdings nur eine qualitative Beurteilungsmöglichkeit dar, um Antibiotica-empfindliche von -unempfindlichen Keimen zu unterscheiden. In besonderen Fällen, die eine genaue quantitative Beurteilung verlangen, wird der Verdünnungstest[8] herangezogen.

Experimentelle Untersuchungen

1. Plättchenverfahren

Die Testung der Salmonellen erstreckte sich auf folgende Hauptantibiotica: Streptomycin, Tetracycline, Chloramphenicol und Kanamycin.

Für den Test wurde die 5%ige Blutagarplatte (p_H 7,4) herangezogen. Nach 18stündiger Bebrütung wurde die Hemmhofgröße bestimmt. Bei Durchmessern über 16 mm gelten die Keime als empfindlich. Die Blutagarplatte ist deshalb gewählt worden, da diese für die meisten Bakterienarten einen Optimalnährboden darstellt. Sie ist auch für die Salmonellentestung gut geeignet, wie ein Vergleich verschiedener Nährböden zeigt (Tab. 1).

Tabelle 1. *Bedeutung des Nährbodens für die Auswertung des Plättchentestes*

Nährbodenplatte		Hemmhof mm ∅	
		Chloramphenicol 10 γ/Plättchen	Kanamycin 10 γ/Plättchen
Agarplatte	3%ig	23	25
Blutagarplatte	5%ig	22	24
Endoagar		23	24
Traubenzuckerblutagarplatte	20%ig	17	16
Kristensen-Jürgens-Platte		20	21

Teststamm: S. manchester. Res.-Wert gegen Chloramphenicol 4 γ/ml.

Die Testplättchen enthalten gemäß der Löslichkeit der einzelnen Antibiotica entsprechende Gammamengen des Antibioticums. Bei schwerer löslichen Substanzen, wie z. B. den Tetracyclinen, verwendet man besser Plättchen mit einem Gehalt von 20 γ. Beim Chloramphenicol sind 10 γ-Plättchen ausreichend, die Hemmhofzonen betragen 20 mm ⌀ und mehr. Empfindliche Stämme zeigen auch beim Kanamycin beim Gebrauch von 10- und 5γ-Plättchen Hemmzonen über 20 mm ⌀, und selbst 2,5γ-Plättchen ergeben noch Hemmhöfe von 16—20 mm ⌀. Die ausgestrichenen oder ausgespatelten Kulturen können sofort nach der Beschickung mit den Antibioticaplättchen bei 37° C bebrütet werden. Ein fünfstündiger Aufenthalt der Kulturen vor der Bebrütung — bei Zimmertemperatur bzw. im Kühlschrank bei +4° C mit einer eventuell besseren Diffusionsmöglichkeit des Antibioticums — ergab bei allen angewandten Antibioticis keinen nennenswerten Unterschied der Hemmhofgrößen.

Ergebnis der Plättchentestung. Für 250 S. manchester-Stämme ergab sich im Plättchenverfahren folgendes Empfindlichkeitsspektrum (Tab. 2).

Tabelle 2

Streptomycim		Tetracycline		Chloramphenicol		Kanamycin	
+	—	+	—	+	—	+	—
247	3	237	13	241	9	250	0

+ empfindlich; — unempfindlich. Empfindlichkeitsspektrum von 250 S. manchester-Stämmen.

Kanamycin bewirkte bei allen 250 Stämmen eine Bacteriostase; Streptomycin bei 98,8%, Chloramphenicol bei 96,4% und Tetracycline bei 94,8%. Insgesamt 15 Stämme waren für verschiedene Antibiotica resistent. Der Plättchentest zeigte keinen Hemmhof; im Verdünnungstest ergaben 20 γ/ml und mehr keinen bacteriostatischen Effekt (Tab. 3).

Tabelle 3. *Resistente Stämme*

Anzahl der Stämme	Streptomycin	Tetracycline	Chloramphenicol	Kanamycin
7	+	—	—	+
5	+	—	+	+
2	—	+	—	+
1	—	—	+	+

+ empfindlich; — resistent.

Interessant ist, daß sich ein Drittel dieser Stämme nicht nur zu Beginn der Epidemie fanden, sondern daß sie auch aus Ausscheidungen von Patienten isoliert wurden, die vorher nicht antibiotisch behandelt worden waren. Es scheint sich daher um eine primäre Resistenz zu handeln.

Die Überprüfung der Fermentationsaktivität der 15 oben angeführten resistenten Stämme ergab bei 7 von ihnen eine deutliche Verzögerung

der Dextrosevergärung. Der Farbumschlag trat in der Dextrose bei 4 Stämmen erst nach zweitägiger Bebrütung auf, während die 3 anderen sogar 3—4 Tage zur Vergärung der Dextrose benötigten. Die Vergärung von Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Adonit, Dulcit, Salicin, Arabinose, Xylose, Sorbit, Rhamnose und Inosit entsprach der Norm. Dagegen konnte bei 30 Antibiotica-empfindlichen S. manchester-Stämmen keine Verzögerung in der Vergärung der angesetzten Kohlenhydrate beobachtet werden. Interessant ist, daß bei einem von drei in der Epidemiezeit isolierten S. hartford-Stämmen ebenfalls die Vergärung der Dextrose um 2 Tage verspätet eintrat.

In der mir zugänglichen Literatur weisen VACZI u. TOLNAI[7] auf eine langsamere Vergärung der Kohlenhydrate bei in vitro gegen Chloramphenicol resistent gezüchteten Typhusstämmen hin. HEISS[2] fand beim Vergleich eines gegen Chloramphenicol empfindlichen Ausgangsstammes von Escherichia coli mit seiner in vitro resistent gezüchteten Variante hinsichtlich der Traubenzuckervergärung keinen signifikanten Unterschied, dagegen konnte in der Milchzuckervergärung ein deutlicher Unterschied statistisch dahingehend gesichert werden, daß die in vitro resistente Variante den p_H-Wert nur ganz gering in den sauren Bereich zu senken vermochte.

2. Röhrchentest

a) Chloramphenicol. In der Klinik wurde hauptsächlich das Chloramphenicol therapeutisch verabreicht. Aus diesem Grunde wurden 135 Stämme neben der qualitativen Bestimmung im Plättchentest auch quantitativ im Verdünnungstest ausgewertet (Tab. 4). Der Hauptanteil der Stämme, nämlich 125, zeigte Bakteriostasewerte in einem Bereich von 2—9 γ/ml. Ein Stamm benötigte 16 γ/ml zur Wachstumshemmung.

Tabelle 4. *Bakteriostase durch Chloramphenicol*

Gammakonzentration ml Bouillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	16	>50
Anzahl der Stämme	—	12	20	42	32	13	4	—	2	1	9

Die Chloramphenicol-Bakteriostaseprüfung zeigt bei S. manchester erwartungsgemäß ähnliche Werte, wie diese von NAUMANN u. MAI[4] mit 0,75—12,5 γ, WELCH[9] 0,2—10 γ, SMADEL[5] 0,5—10 γ u. a. bei anderen Salmonellen angegeben wurden. Allerdings führen diese Autoren keine resistenten Stämme an.

Bei unseren Untersuchungen konnte keine Differenz zwischen dem Ergebnis der Plättchen- und Röhrchenmethode beobachtet werden. Der Plättchentest ist also für eine qualitative Routineuntersuchung zufriedenstellend. Der quantitative Röhrchentest bietet aber die Möglichkeit eines Vergleiches der erzielten Hemmwerte in vitro zum erreichbaren Wirkstoffspiegel in vivo. NAUMANN u. MAI definieren den mittleren therapeutischen Chloramphenicolspiegel mit ca. 7 γ/ml. Tab. 4 zeigt, daß bei dem vorliegenden Untersuchungsgut ein Hemmwert von

7 γ nicht überschritten wird, vielmehr hat der Hauptanteil einen Wert zwischen 2—7 γ/ml. Demgemäß müßte der Wirkstoffspiegel für eine Therapie ausreichend sein.

b) Kanamycin. Langjährige Erfahrungen haben gezeigt, daß beim antibiotischen Röhrchentest die Menge der Keimeinsaat für den Hemmungsgrad ohne wesentliche Bedeutung ist (Penicillin, Streptomycin, Chloramphenicol und anderes).

Zu der gleichen Feststellung kommen Hartgen, Lippelt, Mannweiler u. Matz[1]. Bei ihrem Studium des Einflusses variierter Keimeinsaaten bei S. cholerae suis und S. bredeney wurde bei den Sulfonamiden eine Bakteriostase bei steigender Keimzahl erst durch vielfach höhere Konzentrationen erreicht. Demgegenüber war der Einfluß der Keimmenge bei der Prüfung antibiotischer Substanzen (Penicillin G, Tetracycline) ohne wesentliche Bedeutung, die Schwankungen waren nur im Bereich weniger Zehntelgamma zu beobachten, gleichgültig, ob einige 100 oder gar 10000000 Keime eingesät wurden.

Im Gegensatz zu den bisher im Röhrchenverdünnungstest überprüften Antibioticis war beim Kanamycin der Resistenzwert von der Größe der Keimeinsaat sehr beeinflußbar. Bei der Ablesung — auch bei Wiederholungsuntersuchungen — ergaben sich Differenzen bis zu 5 γ und mehr. Einen Vergleich zwischen Kanamycin und Chloramphenicol ergibt der in der Tab. 5 aufgeführte Versuch. Beim Chloramphenicol blieb der Resistenzwert trotz variierter Keimeinsaat 4 γ/ml, während er beim Kanamycin von 4 auf 10 γ/ml anstieg.

Tabelle 5
Resistenzwert bei variierter Keimeinsaat

Keimeinsaat ml/Bouillon	Chloramphenicol Res. Wert γ	Kanamycin Res. Wert γ
124000	4	4
555000	4	8
2898000	4	10

Der Röhrchentest verlangt also bei der Testung von Kanamycin beim Ansatz eine genaue Bestimmung der Größe der Keimeinsaat und ist daher für laufende Untersuchungen zu umständlich und ungeeignet.

Gleichmäßige Ablesungen werden dagegen mit dem Plattenverfahren erzielt. Den Agarplatten werden dabei verschiedene Kanamycinmengen pro Milliliter Nährboden zugesetzt.

Bei dieser Anordnung konnte bei den vorliegenden Versuchen trotz variierter Keimeinsaat/cm^2 der gleiche Gammagehalt/ml-Nährboden das Wachstum völlig unterbinden.

Insgesamt wurden 85 S. manchester-Stämme im Kanamycin-Agarplattenverfahren ausgetestet (Tab. 6). Der Bereich, in dem das Wachstum der ausgespatelten Kulturen völlig unterbunden wurde, lag zwischen

2 und 4 γ; nur 1 Stamm wurde erst durch einen Gehalt von 8 γ/ml im Wachstum gehemmt.

Tabelle 6. *Bacteriostase durch Kanamycin*

Gammakonzentration ml/Nährboden	1	2	2,25	2,5	2,75	3	4	5	6	7	8
Anzahl der Stämme	0	16	18	9	6	20	15	0	0	0	1

Der therapeutisch erreichbare Maximalspiegel liegt nach den Untersuchungen von HOFMANN, BIECHTELER, MEYTHALER, HOFER, RITTER u. BEDACHT[3] nach einer intramuskulären Injektion von 1,0 g Kanamycin 3 Std nach der Verabreichung im Durchschnitt bei 14,1 γ/ml, um nach weiteren 3 Std auf 4,6 γ/ml abzusinken. Unsere Empfindlichkeitsbestimmungen zeigen, daß die S. manchester-Stämme durchaus im Bereich dieses Wirkstoffspiegels liegen.

Klinische Beobachtungen

In der Medizinischen Klinik der Städtischen Krankenanstalten Bremen wurden die Behandlungen bei Erkrankten und Keimträgern mit Chloramphenicol langzeitig durchgeführt. Es wurden täglich 2 g über 10 Tage verabreicht, nach 5 Tagen Pause wurden nochmals 5 Tage lang je 2 g, insgesamt also 30 g, gegeben. Die Erfolge der Chloramphenicolbehandlungen waren sehr wechselnd und im ganzen unbefriedigend; nur die Hälfte von 96 Erkrankten war nach dieser Behandlung frei von Salmonellen, bei 63 Salmonellenträgern wurden nach der Behandlung noch 23 gezählt. Die Behandlungsergebnisse von Streptomycin und Kanamycin waren nicht besser, ebenfalls nicht die Kombination von Streptomycin und Madribon oder von einem Tetracyclin mit Resulfon. (Mitteilung von Herrn Prof. STROEBE auf der 54. Tagung der Nordwestdeutschen Gesellschaft für Innere Medizin in Hamburg[6].)

Da die Antibiotica-Therapie unbefriedigend verlief, wurde auf meinen Vorschlag hin zusätzlich zur Normalisierung der Darmflora eine Schluckbehandlung mit lebenden Colibakterien durchgeführt. Die Coli-Schluckvaccine enthielt 200 Millionen Keime/ml. Der zur Herstellung verwandte E. coli-Stamm war außer Kanamycin und Furadantin gegen Streptomycin, Tetracycline und Chloramphenicol resistent. Die Chloramphenicolresistenz des Stammes erlaubte gleichzeitig eine Behandlung mit Chloramphenicol. Dem Patienten wurden morgens nüchtern 1 Std vor Beginn der üblichen Chloramphenicolbehandlung 30 Tropfen der lebenden Colivaccine oral verabreicht. Diese Therapie wurde sowohl in den Kliniken als auch später von frei praktizierenden Ärzten durchgeführt.

In 80 Fällen konnte der Verlauf verfolgt werden. Der verabreichte E. coli-Stamm war in ein paar Tagen nachweislich im Darm angesiedelt, er konnte auch bei Wiederholungsuntersuchungen aus dem Stuhl isoliert und mittels der Resistenzbestimmung bestätigt werden. Der Therapieerfolg dieser Kombination — Vaccine und Antibiotica — war bemerkenswert; von den 80 Patienten waren nach Behandlungsabschluß 62 salmonellenfrei. Bei drei älteren Frauen trat als Komplikation eine Cystitis auf, der gefütterte E. coli-Stamm konnte aus dem Katheterurin isoliert werden. Jedoch war die Cystitis leicht und konnte in ein paar Tagen durch Gaben von Furadantin beherrscht werden, so daß die Kombinationsbehandlung weitergeführt werden konnte.

Diskussion

In vitro zeigten Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracycline und Kanamycin bei der weitaus größten Anzahl der S. manchester-Stämme, nämlich bei 235 (94%), eine gute bakteriostatische Wirkung, nur 15 Stämme (6%) waren für das eine oder andere Antibioticum resistent. Jedoch standen die günstigen Resistenzergebnisse im Widerspruch zu der klinischen Sanierung. Eine Resistenzzunahme der Erreger während der antibiotischen Behandlung, die eventuell das Versagen der Antibiotica erklärt hätte, konnte nicht beobachtet werden.

Vor ein paar Jahren konnte bei einer S. typhi murium-Endemie die Beobachtung gemacht werden, daß in der einen Klinik die Patienten ohne antibiotische Behandlung größtenteils nach 8—14 Tagen frei von Salmonellen waren. Dagegen waren in einer anderen Klinik, in der sofort zu Beginn der Erkrankung eine antibiotische Behandlung durchgeführt wurde, die Erkrankten nicht nur erst nach mehreren Wochen bazillenfrei, sondern stellten auch ein großes Kontingent von Dauerausscheidern. Es hat den Anschein, daß es auch bei der S. manchester durch die antibiotische Behandlung zu einer Keimpersistenz kommt, die eventuell auf eine Störung des biologischen Gleichgewichts der normalen physiologischen Darmflora mit ihrem wirksamen Antagonismus zurückzuführen ist, d. h. die Salmonellen können nach Absetzen der Therapie erneut aufleben, wodurch das Keimträgertum gefördert wird. Die neben der Antibioticabehandlung zusätzliche Verabreichung einer Coli-Schluckvaccine führte zu einem weitaus größeren Behandlungserfolg.

Zusammenfassung

250 S. manchester-Stämme wurden gegenüber Streptomycin, Tetracyclinen und Chloramphenicol qualitativ ausgetestet. Bei 235 (94%) zeigten die Antibiotica eine gute bakteriostatische Wirkung. Nur 15 Stämme (6%) waren gegen das eine oder andere der genannten Antibiotica resistent.

Chloramphenicol- und Kanamycin-Resistenzbestimmungen wurden außerdem quantitativ mit Hilfe des Verdünnungstestes durchgeführt. Die festgestellten Resistenzwerte lagen im vitro-Test unterhalb der Grenze, die im Serumspiegel eines Patienten erreicht werden kann.

Trotzdem war die antibiotische Behandlung nicht zufriedenstellend. Eine zusätzliche Verabreichung einer Coli-Schluckvaccine konnte den Therapieerfolg wesentlich verbessern.

Literatur

[1] Hartgen, H., H. Lippelt, E. Mannweiler u. K. Katz: Untersuchungen über bakteriostatische Konzentrationen der Sulfonamide und Antibiotica bei seltenen Salmonellen. Z. Tropenmed. 8, 141 (1957).

[2] Heiss, F.: Vergleichende Untersuchungen mit Escherichia coli zur Frage der Resistenzausbildung bei Chloramphenicoltherapie. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig **164**, 227 (1955).

[3] Hoffmann, P., W. Biechteler, F. Meythaler, E. Hofer, L. Ritter u. R. Bedacht: Bakteriologische und klinische Ergebnisse mit „Resistomycin (Kanamycin „Bayer"). Münch. med. Wschr. **1959**, 1444.

[4] Naumann, P., u. K. Mai: Wirkstoffspiegel und mikrobiologische Grundlage der intramuskulären Chloramphenicol-Therapie. Dtsch. med. Wschr. **1959**, 2013.

[5] Smadel, E.: Amer. J. Med. **7**, 671 (1949): zit. bei Naumann, P., u. K. Mai: Wirkstoffspiegel und mikrobiologische Grundlage der intramuskulären Chloramphenicol-Therapie. Dtsch. med. Wschr. **1959**, 2013.

[6] Stroebe, F.: Erfahrungen bei einer Paratyphus-C-Endemie (Salmonella manchester) in Bremen: Kongreßbericht 54. Tagung Nordwestdeutsche Gesellschaft für Innere Medizin 1960, S. 41. Lübeck: Hansisches Verlagskontor 1960.

[7] Vaczi, L., u. G. Tolnai: Die Virulenz chloramphenicolresistenter S. typhi-Stämme. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **4**, 123 (1957). — Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **165**, 337 (1957).

[8] Warnecke, B.: Der Penicillintest und seine Bedeutung für die Klinik. Z. klin. Med. **147**, 199 (1950).

[9] Welch, H.: Principles and practise of antibiotic-therapy. New York 1954. — Zit. bei Naumann, P., u. K. Mai: Wirkstoffspiegel und mikrobiologische Grundlage der intramuskulären Chloramphenicol-Therapie. Dtsch. med. Wschr. **1959**, 2013.

Dr. Bernd Warnecke,
Bakteriolog.Serolog. Abteilung des Staatl. Hygiene-Institut, 28 Bremen

Zeitschrift f. Hygiene 148, 553—556 (1962)

Medical Research Institute, Colombo, Ceylon

A new Medium for enteric Bacteriology III

By
T. Velaudapillai

(Received July 17, 1962)

Kligler's medium (1918) separates lactose and nonlactose fermenting organisms. The medium modified by Schmid, Chapman and Velaudapillai (1953) in addition to the above mentioned properties separates *Proteus* and a certain proportion of *Klebsiella*. The medium further modified by Velaudapillai and Schmid (1954) differentiates *Shigellla* from *Salmonella*. But the organisms screened by all these media are not all pathogenic.

This paper describes a further modified Kligler's medium which eliminates sucrose fermenting organisms.

Materials and Methods

Hajna's medium (1945) i.e. Kligler's medium with 1% sucrose was overlayered over soft agar and urea (Velaudapillai and Schmid 1954). Organisms not fermenting lactose and fermenting sucrose were inoculated into this medium. It was found that all such organisms did not turn the medium yellow. After some trials, a medium with 5% sucrose was found to ferment them (Velaudapillai 1957).

Although this medium is effective, the preparation of the three layer medium is fairly time consuming. Therefore, trials were conducted to include urea into the soft agar. Kligler's medium with 5% sucrose was overlayered over soft agar containing urea (Christensen 1946). The sucrose fermenters readily made the slants yellow but produced excess gas. The excess gas formation was reduced by the addition of 0.2 g potassium nitrate (Tubiash 1952) per litre of Kligler's medium.

The final medium is prepared as follows:

Bottom layer (soft agar with urea)

A.	Bacteriological peptone	10.0 g
	Sodium chloride	5.0 g
	Lab-Lemco (Oxoid)	10.0 g
	Potassium nitrate	0.1 g
	Agar powder (Davis)	4.0 g
	Distilled water	1000.0 ml

The medium is dissolved by heating and the p_H adjusted to 7.4. It is sterilized in an autoclave at 10 lb. pressure (115°C) for 20 min.

B.		
	Bacteriological peptone	1.0 g
	Glucose	1.0 g
	Sodium chloride	5.0 g
	Sodium phosphate	1.2 g
	Potassium phosphate	0.8 g
	Urea	20.0 g
	Phenol red	0.012 g
	Distilled water	1000.0 ml

The solution is dissolved by gentle heating and the p_H adjusted to 6.4. It is sterilized by passing through a Seitz filter.

To every 900 ml of melted agar (A) at 60°C, 100 ml of urea solution (B) also at 60°C are added. It is then distributed under sterile conditions into tubes to a height of 1 inch by means of a separating funnel. It is allowed to set for a day.

Top layer (Kligler's medium with sucrose and potassium nitrate)

Lab-Lemco (Oxoid)	3.0 g
Yeast extract	3.0 g
Bacteriological peptone	20.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Lactose	10.0 g
Dextrose	1.0 g
Sucrose	50.0 g
Ferrous sulphate	0.2 g
Sodium thiosulphate ($5H_2O$)	0.3 g
Potassium nitrate	0.2 g
Phenol red	0.025 g
Agar powder (Davis)	12.5 g
Distilled water	1000.0 ml

The medium is dissolved by heating and the p_H adjusted to 7.4. This is then sterilized in an autoclave at 10 lb. pressure for 20 min. It is overlayered over tubes with soft agar and urea mixture, in amount which results, when tubes are slanted, in a butt of about $^1/_2$ inch an a good slant. Here again the distribution is done under sterile conditions by means of a separating funnel.

Oxoid or Difco brands of Kligler's medium can be used.

Method of inoculation. Using a straight wire a streak is first made over the slant. The wire is then stabbed to the bottom of the soft agar, withdrawn and slant smeared.

Results

The medium was first tested on 230 known salmonellae and 177 shigellae, they gave the correct reactions. *Salm. paratyphi A* does not produce much gas. Several strains of this organism were tested and were found to produce gas. *Shigella sonnei* is a late lactose fermenter. It produces the normal reactions in this medium. Organisms of the *Proteus* and *Escherichia* groups gave the expected reactions.

All organisms producing yellow butt and red slant with or without gas and not splitting urea and reacting serologically negative with salmonellae and shigellae sera were subcultured in the mornings into nutrient broth. In the evenings they were passed into (C) 1% sucrose broth, (D) urea soft agar Kligler's medium without sucrose and (E) urea agar Kligler's

medium with 5% sucrose and potassium nitrate. On the following mornings the results were read. Classification of non-pathogenic organisms is given below.

Non-urea splitting *Salmonella* like organisms

	Salm. typhi like organism, butt yellow, slant red with no gas Medium		*Salmonella* like organisms, butt yellow, slant red with or without gas and H_2S Medium	
	D	E	D	E
Sucrose (C) +	4	0	605	0
Sucrose (C) −	55	55	200	200
Total	59	55	805	200

C, D and E are the three different media described above. + = fermentation, − = no fermentation.

It will be observed that 805 organisms gave *Salmonella* like reactions in the routine KLIGLER's medium, whereas only 200 gave similar reactions in the new medium. It did not show much difference with organisms giving reactions like *Salm. typhi*.

Discussion

The combined medium with urea and soft agar together with KLIGLER's medium to which 5% sucrose was incorporated, separates *Escherichia*, *Proteus* from enteric pathogens. It was able to eliminate 609 out of 864 organisms giving similar reactions to those of salmonellae. A few organisms fermented liquid sucrose on the 2nd day, whereas in the new medium fermentation occurred within 24 hrs, as it contained a high percentage of sucrose. NETER (1945) pointed out that HAJNA's 1% sucrose medium (1945) did not always eliminate all sucrose fermenting organisms. The results of the present investigation are in agreement with those of FULTON and HARRISON (1943) who found fermentation was rapid with 5% sucrose.

Three sugars are used in this medium. Some of the organisms might ferment all the three sugars and produce excess gas. The excess of gas must be due to the splitting of sucrose as in the KLIGLER's medium with two sugars normal amounts of gas were produced. Potassium nitrate produces an anaerogenic effect (TUBIASH 1952). With addition of 0.2 g of potassium nitrate per litre of KLIGLER's medium the excess of gas formation was reduced. This medium screens considerable proportions of non-pathogens and, therefore, will ease the work of laboratories which handle large numbers of specimens.

Summary

A simple medium consisting of Kligler's medium with 5% sucrose together with urea and soft agar differentiates *Shigella*, *Salmonella Proteus* and *Escherichia*. It eliminates sucrose fermenting organisms.

References

Christensen, W. K.: Urea decomposition as a means of differentiating proteus and paracolon cultures from each other and from salmonella and shigella types. J. Bact. **52**, 461—466 (1946).

Fulton, M., and P. E. Harrison: The characteristics of proteus ammoniae. J. Bact. **46**, 365—367 (1943).

Hajna, A. A.: Triple-sugar iron agar medium for the classification of the intestinal group of bacteria. J. Bact. **49**, 516—517 (1945).

Kligler, I. J.: Modifications of culture media used in the isolation and differentiation of typhoid, dysentery and allied bacilli. J. exp. Med. **28**, 319—322 (1918).

Neter, N.: The reactions in triple-sugar iron agar produced by paracolon and proteus bacilli. J. Bact. **50**, 609 (1945).

Schmid, E. E., T. E. D. Chapman and T. Velaudapillai: A new medium for enteric bacteriology. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **136**, 115—118 (1953).

Tubiash, H. S.: An anaerogenic effect of nitrates and nitrites on representative strains of *Salmonella*. Amer. J. publ. Hlth **42**, 1060—1061 (1952).

Velaudapillai, T.: A single medium for differentiating *Salmonella*, *Shigella* and other organisms of the *Enterobacteriaceae* group. J. Path. Bact. **74**, 244 (1957).

Velaudapillai, T., and E. E. Schmid: A new medium for enteric bacteriology 11. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **140**, 85—86 (1954).

Dr. T. Velaudapillai,
Medical Research Institute, Colombo/Ceylon

Zeitschrift f. Hygiene 148, 557–564 (1962)

Aus der Staatlichen Bakteriologischen Untersuchungsanstalt München
(Direktor: Dr. med. Bl. Freytag)

Virologische und serologische Befunde bei gehäuft auftretenden Echovirus Typ 8-Infektionen*

Von
Wolf Henigst**

(Eingegangen am 24. August 1962)

Veröffentlichungen über das Vorkommen von Echovirus Typ 8 sind nicht sehr zahlreich. Der Prototyp Stamm „Bryson" wurde von M. Ramos-Alvarez u. A. B. Sabin in Ohio (USA) aus dem Stuhl eines gesunden Individuums isoliert[20]. Die Feststellung von McNair Scott[12], daß die Enteroviren als Gruppe beim Menschen endemisch auftreten, also in sämtlichen Erdteilen vorkommen müßten, trifft auch auf Echo 8 zu. Nach Gelfand[4] wurde das Virus in Ägypten, Australien, Guatemala, Hawai, Kongo, Mexiko, UdSSR, USA und Westeuropa isoliert.

Das Wirtsspektrum der Echoviren beschränkt sich, von wenigen Zufällen bzw. experimentellen Infektionen abgesehen, offensichtlich auf den Menschen. Die Bedeutung des Auftretens niederer Titer neutralisierender Antikörper in verschiedenen Tierseren scheint noch nicht einhellig geklärt zu sein[10]. Besonders interessant ist deshalb hier die Mitteilung von Moscovici et al.[14], daß einer ihrer Virusstämme, die sie von Schweineexkrementen isolieren konnten, von Echo 8 Antiserum neutralisiert wurde. Bei weiteren Untersuchungen ließ sich jedoch die Identität dieses Virus mit Echo 8 nicht erhärten[25].

Die pathogenetische Bedeutung von Echovirus Typ 8 schien für viele Jahre zweifelhaft oder äußerst gering zu sein. Erst in den letzten Jahren wird auch Echo 8 für sporadische Fälle von aseptischer Meningitis[12], Durchfälle[22] und für respiratorische und gastrointestinale Symptome[24] verantwortlich gemacht. Nach allen vorliegenden Beobachtungen müssen jedoch die meisten Echo 8-Infektionen inapparent verlaufen. Eingehendere Untersuchungen über derartige Infektionen sind daher nicht ohne weiteres zu erstellen, da das Geschehen natürlicherweise meist unerkannt bleibt. Durch Zufall konnten in der Nähe Münchens in einem Kinderheim, dessen Kinder aus anderen Gründen laufend virologisch überwacht wurden, etliche Echovirus Typ 8-Infektionen entdeckt und genauer untersucht werden.

Material und Methoden

Im Verlaufe des Jahres 1961 wurde in mehreren Kinderheimen in und um München Poliomehrfachimpfstoff vom Typ Salk unter virologischer Kontrolle verabreicht, um die anschließend einsetzende Antikörperbildung genau bestimmen

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Kinderlähmung.

** Mit technischer Assistenz von Frau V. Stürtz und Frl. H. Budde.

zu können. Im Kinderheim St., in dem die folgenden Beobachtungen gemacht werden konnten, wurden die Kinder im Säuglingsalter aufgenommen und verblieben dort bis zum ca. 3. Lebensjahr. Um das Auftreten von Infektionen durch eingeschleppte „Wild-Viren" zu erkennen, wurden während der Dauer der Impfaktion, die sich über 4 Monate hinzog, von einem kleinen Teil der Impflinge alle 14 Tage Stuhlproben virologisch untersucht. Zur Feststellung des Antikörperstatus wurden den Kindern zu verschiedenen Zeitpunkten vor, während und nach der Impfung Blutproben entnommen. Die Seren wurden zu einem erheblichen Teil zur Bestimmung des Antikörpergehaltes gegen die drei Poliovirustypen aufgebraucht, und es standen deshalb nur Reste für die unten geschilderten Untersuchungen zur Verfügung.

Die Stuhluntersuchungen wurden ausschließlich mit stationären Affennierenzellröhrchen durchgeführt, die Teste nach einem Isolierversuch mit 1 ml 10%igem Stuhlextrakt und einer Blindpassage abgeschlossen. Falls ein Virus isoliert werden konnte, wurden, wenn notwendig, weitere Passagen in Affennierenzellkulturen angeschlossen und schließlich 100 Gewebekultur-ID 50 mit verschiedenen polivalenten und monovalenten Kaninchen-Antiseren* zu identifizieren versucht. Zur Bestätigung des Isolierergebnisses wurden positive Stuhlproben jeweils ein zweites Mal auf ihren Virusgehalt untersucht. Die Viruskonzentration im Stuhl wurde durch Austitrieren des Stuhlextraktes in Verdünnungsreihen mit dem Verdünnungsfaktor 10 in Affennierenzellkulturen festgestellt. Vier Röhrchen je Verdünnung wurden verwendet, die ID 50 nach der Methode von Reed u. Muench[23] errechnet und auf 1 g Stuhl bezogen angegeben.

Die serologischen Arbeiten wurden ausschließlich in stationären Röhrchen von menschlichen Amnionzellkulturen durchgeführt. Als Testviren wurde für Echo 8 der Prototyp Stamm „Bryson", für Echo 1 der Prototyp Stamm „Farouk" in einer jeweiligen Konzentration von 100 Gewebekultur-ID 50 verwendet.

Ergebnisse

1. Die Infektionen der Heimkinder

In dem oben erwähnten Kinderheim wurden die Stühle von 10 Kindern, die als „Indicatoren" für auftretende Virusinfektionen dienen sollten, laufend untersucht. Die alle 14 Tage erfolgte Einsendung des Untersuchungsmaterials unterblieb leider am 11. Juli 1961. Aus den Stuhlproben, die am 25. Juli eingesandt wurden, konnte in 2 Fällen ein Nichtpolio-Enterovirus isoliert werden. Wegen anderweitiger dringender Arbeiten wurden diese Viren erst später als Echo 8-Viren identifiziert. Die interessante Untersuchung weiterer Stühle von anderen Heiminsassen und Pflegepersonal konnte deshalb nicht rechtzeitig durchgeführt werden. In den nächsten Stuhleinsendungen häuften sich die Virusisolierungen (Tab. 1): Am 8. 8. konnten aus vier Stühlen Viren isoliert werden, am 22. 8. und am 5. 9. gelang je dreimal ein Virusnachweis, am 19. 9. zweimal und am 3. 10 wurde das letzte Nichtpolioenterovirus isoliert. Es waren also im Verlaufe von 42 Tagen 8 der 10 beobachteten Kinder infiziert worden. Von den Stühlen der beiden restlichen konnte bis zum Ende der Stuhlsammelaktion kein Virus isoliert werden. 11 der 15 positiven Stuhlextrakte wurden auf die Menge ihres Virusgehaltes

* Die Seren wurden von Microbiological Ass. Inc., USA, bezogen.

Tabelle 1. *Echovirus Typ 8 Isolierungen aus den Stühlen der 8 Kleinkinder, von denen im 2. Halbjahr 1961 regelmäßig Stuhlproben untersucht wurden*

Fall	Datum der Stuhleinsendung (1961)						Virus-isolierungen
	25. 7.	8. 8.	22. 8.	5. 9.	19. 9.	3. 10.	
C. M.	−	−	−	+	+	+	3
J. G.	−	+	+	−	−	−	2
D. H.	−	+	−	−	−	−	1
W. O.	−	+	+	+	−	−	3
P. M.	−	+	−	−	−	−	1
F. R.	−	−	+	+	+	−	3
M. S.	+	−	−	−	−	−	1
H. D.	+	−	−	−	−	−	1
Virusisolierung	2	4	3	3	2	1	Insgesamt 15
Neue Fälle	2	4	1	1	0	0	8

− = kein Virus isoliert, + = Echovirus Typ 8 isoliert.

Tabelle 2. *Aufstellung der virologischen und serologischen Ergebnisse von Untersuchungen bei 8 Kleinkindern mit Echovirus Typ 8-Infektionen*

Datum der Blutabnahme	Höhe des Antikörpertiters			
	Cornelia M. 26 Monate*	Jürgen G. 25 Monate	Doris H. 22 Monate	Willi O. 20 Monate
5. 6. 1961	< 1:4	< 1:4	< 1:4	< 1:4
Virusisolierung aus dem Stuhl	5. 9./R/$10^{4,0}$**	8. 8.	8. 8./R/$10^{4,0}$	8. 8./R/$10^{5,5}$
	19. 9.	22. 8./R/$10^{5,5}$	—	22. 8.
	3. 10./R/$10^{4,5}$	—	—	5. 9./R/$10^{4,5}$
5./6. 10. 1961	1:16	1:512	1:32	1:64
3. 1. 1962	1:16	1:32	1:8	1:32
2. 7. 1962	1:8	1:16	X	1:64

Datum der Blutabnahme	Höhe des Antikörpertiters			
	Peter M. 18 Monate	Fritz R. 15 Monate	Maria S. 11 Monate	Hansi D. 11 Monate
5. 6. 1961	z. w. S.	< 1:4	< 1:4	< 1:16
Virusisolierung aus dem Stuhl	8. 8./R/$10^{4,0}$	22. 8./R/$10^{4,9}$	25. 7./R/$10^{2,9}$	25. 7./R/$10^{2,8}$
	—	5. 9.	—	—
	—	19. 9./R/$10^{4,0}$	—	—
5./6. 10. 1961	1:8	1:64	1:16	1:32
3. 1. 1962	z. w. S.	1:64	1:16	z. w. S.
2. 7. 1962	1:32	X	z. w. S.	1:16

* = Alter zur Zeit der Infektion; R = Zur Kontrolle wurde eine Wiederholung der Virusisolierung und Typisierung vorgenommen; ** = Gewebekultur-ID 50 pro Gramm Stuhl; X = Kind ist aus dem Heim ausgeschieden; z. w. S. = zu wenig Serum für Test vorhanden.

untersucht (siehe Tab. 2). Das arithmetische Mittel pro Gramm Stuhl betrug $10^{4,2}$ Gewebekultur-ID 50.

Durch die für andere Zwecke am 5. Juni und 5. bzw. 6. Oktober 1961 und am 3. Januar und 2. Juli 1962 entnommenen Blutproben waren wir in der Lage, den Antikörperstatus gegen Echovirus Typ 8 vor und zu verschiedenen Zeiten nach der erfolgten Infektion festzustellen. Bei 6 von 8 Kindern war eine ausreichende Serummenge vorhanden, um nachzuweisen, daß vor der Infektion in einer Serumverdünnung von 1:4 keine Antikörper gegen Echo 8 vorhanden waren. Die Titerhöhen 1 bis 2,5 Monate nach der ersten Virusisolierung erreichten mit einer Ausnahme keine beträchtlichen Werte. Ihr Mittelwert lag (nicht eingeschlossen der Fall J. G.) bei 1:32. Nach 5 Monaten sanken die Einzelwerte bei 2 Individuen signifikant ab, waren jedoch nach 10—11,5 Monaten bei den 5 noch erreichbaren Fällen immer noch nachweisbar. Ihr Mittelwert lag zu diesem Zeitpunkt bei 1:26. (In Tab. 2 sind die Ergebnisse der virologischen und serologischen Untersuchungen im einzelnen aufgeführt.)

2. Ergänzende serologische Untersuchungen

Von einer früher vorgenommenen serologischen Übersichtsuntersuchung auf Antikörper gegen Coxsackieviren[8], die mit einer größeren Anzahl von Blutproben von Personen aus dem Umkreis von München durchgeführt worden waren, standen

Tabelle 3. *Neutralisierende Antikörper gegen Echovirus Typ 8 in den 1:5 verdünnten Seren von 432 Personen aus München und Umgebung*

Altersgruppe (in Jahren)	Zahl der Untersuchten	Antikörper gegen E 8	Prozent positiv
0	5	—	—
1	20	—	—
2	14	1	7,1
3—4	28	2	7,1
5—9	34	1	2,9
10—14	42	3	7,1
15—19	38	1	2,6
20—29	98	15	15,3
30—39	66	18	27,2
40—69	60	18	30,0
70 und älter	27	10	37,0
insgesamt	432	69	15,9

Tabelle 4. *Die Titerhöhen von neutralisierenden Antikörpern gegen Echovirus Typ 1 in den Seren von Individuen, die Antikörper gegen Echovirus Typ 8 aufwiesen*

Labornummer	Titer gegen E 8	Titer gegen E 1
282	1:16	1:4
287	1:16	1:8
288	1:32	1:8
290	1:16	1:4
291	1:32	1:4
292	1:4	$<$ 1:4
297	1:4	$<$ 1:4
299	1:8	1:4
304	1:4	$<$ 1:4
306	1:32	1:4

noch 432 Seren von Individuen verschiedenen Alters zur Verfügung. Diese wurden in einer Verdünnung von 1:5 auf das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gegen Echovirus Typ 8 untersucht. Fast 16% aller untersuchten Seren unterbanden den cytopathischen Effekt von E 8 in Amniongewebekulturen.

Personen von 40 Jahren und älter zeigten zu wenigstens 30% gegen Echovirus Typ 8 wirkende Antikörper (Tab. 3). 58 der 69 positiven Seren waren in ausreichender Menge vorhanden, um auch die Titerhöhe ihrer Antikörper feststellen zu können. Diese betrug bei 24 Seren 1:5, bei 11 Seren 1:8, bei 9 Seren 1:16, bei 10 Seren 1:32, bei 3 Seren 1:64 und bei einer Probe mehr als 1:128.

Wegen der offensichtlich sehr nahen Verwandtschaft von Echovirus Typ 8 und Typ 1 wurden 10 der positiven Seren auch auf Antikörper gegen E1 untersucht. Fünf der Proben zeigten gegen Echo 1 einen wenigstens vierfach niedrigeren Titer als gegen Echo 8, während 3 weitere Proben mit niederem Anti-E8-Titer in einer Verdünnung von 1:4 keine Antikörper gegen Echo 1 aufwiesen (Tab. 4).

Diskussion

Der Zeitpunkt des Auftretens der beschriebenen Echovirus Typ 8-Infektionen in dem erwähnten Kinderheim erlaubt kaum epidemiologische Rückschlüsse. Vermutlich werden bei der Einschleppung des Virus alle Kinder ohne spezifische Immunkörper gewesen sein, so daß die Infektion rasch um sich greifen konnte. Auffällige Erkrankungssymptome sind zur Zeit der Echo 8-Infektionen im Kinderheim St. nicht aufgetreten. Damit werden die Beobachtungen einer Anzahl von Autoren bestätigt, die keinen Zusammenhang zwischen Echo 8-Infektion und Erkrankung feststellen konnten[6,13,16,19,21]. Die stillen Feiungen, die durchaus nicht bei allen Enterovirustypen gleich häufig vorzukommen scheinen[3,11], dürften bei Echo 8 zumindest außerordentlich zahlreich sein.

Die Hälfte der acht Kinder schied das Virus nur für kurze Zeit aus. Es gelang bei ihnen nur aus einer einzigen Stuhlprobe eine Virusisolierung. Bei dreien der Kinder war jedoch das Echo 8 Virus noch 28 Tage nach dem ersten Virusnachweis im Stuhl vorhanden. Die ausgeschiedene Virusmenge erreichte in einzelnen Proben beträchtliche Höhen (bis zu $10^{5,5}$ ID 50 pro Gramm Stuhl), blieb jedoch im Durchschnitt mit $10^{4,2}$ Gewebekultur-ID 50 ungefähr in der gleichen Höhe, wie sie bei den Infektionen in Louisiana für denselben Virustyp beobachtet worden war ($10^{4,5}$ GK-ID 50)[9].

Wegen der Beurteilung von hin und wieder festzustellenden neutralisierenden Antikörpern in Seren unserer Routineuntersuchungen erschien uns die Beobachtung über die Entwicklung der Antikörpertiter nach Echo 8-Infektionen von besonderem Interesse. Im allgemeinen scheinen die Titer keine großen Höhen zu erreichen, wenn auch Ausnahmen wie bei dem Fall Jürgen G. vorkommen können. Daß die Titer im Verlaufe von einigen Monaten signifikant abfallen können, wie es bei 2 der 8 Kinder zu beobachten war, stand zu erwarten. Die Ursache des Vierfach-Titeranstieges im Falle Peter M. 9 Monate nach der ersten postinfektiösen Antikörperbestimmung konnte nicht geklärt werden. Vielleicht hat das Kind in der Zwischenzeit eine Reinfektion mit Echo 8 erlitten. Wichtig erschien bei diesen Untersuchungen, daß nach 10 bis 11,5 Monaten bei den noch erreichbaren 5 Kindern neutralisierende Antikörper gegen Echovirus Typ 8 in beträchtlicher Höhe nachweisbar waren. Diese Antikörper dürften demnach für lange Zeit, vermutlich

lebenslang, feststellbar sein, ähnlich wie z. B. neutralisierende Antikörper gegen Polioviren oder die Echovirustypen 7[9] oder 16[15], was nicht als selbstverständlich angenommen werden konnte, da neutralisierende Antikörper z. B. gegen Echovirus Typ 11 häufig sehr bald nach der Infektion aus der Blutbahn zu verschwinden scheinen[17,18].

Diese Ergebnisse veranlaßten uns zu der genaueren Bestimmung der Anzahl von antikörperpositiven Individuen eines Personenkreises, der als einigermaßen repräsentativer Querschnitt durch die Bevölkerung im Umkreis von München gelten konnte. Die 432 verfügbaren Seren stammten von Personen aller Lebensalter (siehe Tab. 3). Während die weiter zurückliegenden Untersuchungen aus dem Jahre 1958[7] mit einer kleinen Zahl von Seren nur einige wenige Antikörperträger vermuten ließen, fand sich nun insbesondere in den Altersklassen über 30 Jahre eine beträchtliche Anzahl antikörperpositiver Personen, die doch eine erhebliche Verbreitung von Echovirus Typ 8-Infektionen in unseren Breiten vermuten läßt. Die Titerhöhen der meisten positiven Seren konnten bestimmt werden und waren nach den Beobachtungen an den 8 Kleinkindern erwartungsgemäß meist sehr niedrig. Die Häufung seropositiver Personen in den höheren Altersklassen dürfte als weiterer Beweis dafür angesehen werden, daß die neutralisierenden Antikörper gegen Echo 8 zumindest viele Jahre lang nachweisbar bleiben.

Durch die sehr nahe serologische Verwandtschaft von Echovirus Typ 8 und Typ 1[1,2,26] bestand allerdings theoretisch die Möglichkeit, daß Antikörper gegen E1 die Anwesenheit von Antikörpern gegen E8 vortäuschen könnten. Gibbels u. Scheid[5] hatten bei ihren Untersuchungen das Vorkommen von Antikörpern gegen Echo Typ 1 Virus in den Seren von Personen der Altersklassen über 15 Jahre aus dem Raum Köln verhältnismäßig häufig nachweisen können. Um diese Fehlerquelle nach Möglichkeit auszuschließen, wurden Parallelbestimmungen der Titerhöhen von Antikörpern gegen E8 und E1 in 10 der oben erwähnten positiven Seren durchgeführt (Tab. 4). Da die Titerhöhe gegen E1 in wenigstens der Hälfte der Teste einen vierfach niedrigeren Titer aufwies als gegen E8 und in drei weiteren Proben keine Antikörper gegen E1 nachweisbar waren, erscheint die Annahme erlaubt, daß es sich bei den nachgewiesenen Antikörpern zumindest zum allergrößten Teil um E8-Antikörper handeln dürfte.

Auch nach den hier beschriebenen Beobachtungen bleibt das Echovirus Typ 8 im wesentlichen ein „orphan", eine Waise ohne zugehöriges Krankheitsbild. Ebenso bleibt die interessante Hypothese von Melnick[13], daß es sich bei Echo 8 (und Echo 7) möglicherweise um die apathogenen Vorfahren der Polioviren handeln könnte, weiterhin unbeantwortet.

Zusammenfassung

Die virologischen und serologischen Ergebnisse von acht eingehend untersuchten Echovirus Typ 8-Infektionen werden mitgeteilt. Die für längere Zeit in wenig veränderter Titerhöhe nachweisbaren neutralisierenden Antikörper gegen Echo 8 ließen eine serologische Übersichtsunter-

suchung auf das Vorkommen dieser Antikörper in einer repräsentativen Gruppe der Bevölkerung sinnvoll erscheinen. Fast 16% von 432 Personen verschiedenen Alters wiesen neutralisierende Antikörper auf, die mit großer Wahrscheinlichkeit als Folge von Echovirus Typ 8-Infektionen gebildet wurden.

Literatur

[1] Committee on the Echo-Viruses: Enteric cytopathogenic human orphan (Echo) viruses. Science **122**, 1187—1188 (1955).

[2] Committee on Enteroviruses: Classification of human enteroviruses. Virology **16**, 501—504 (1962).

[3] Eichenwald, H. F., A. Ababio, A. M. Arky and A. P. Hartmann: Epidemic diarrhea in premature and older infants caused by Echo virus type 18. J. Amer. med. Ass. **166**, 1563—1566 (1958).

[4] Gelfand, H. M.: The occurence in nature of the Coxsackie and Echo viruses. Progr. med. Virol., Bd. **3**, S. 193—244. Basel/New York: Karger 1961.

[5] Gibbels, E., u. W. Scheid: Über das Verhalten neutralisierender Antikörper gegenüber 14 Echo-Virustypen bei Kindern und Erwachsenen aus Westdeutschland. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **182**, 425—442 (1961).

[6] Habel, K., R. J. Silverberg and A. Shelokov: Isolation of enteric viruses from cases of aseptic meningitis. Ann. N. Y. Acad. Sci. **67**, 223—229 (1957).

[7] Henigst, W.: Beitrag zur Epidemiologie der Echoviren. Dtsch. med. Wschr. **84**, 1022—1028 (1959).

[8] Henigst, W.: Orientierende Untersuchungen über das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gegen Coxsackieviren in der gesunden Bevölkerung. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **148**, 307—317 (1962).

[9] Henigst, W. W., H. M. Gelfand, D. R. LeBlanc and J. F. Fox: Echo virus type 7 infections in a continuously observed population group in Southern Louisiana. Amer. J. trop. Med. Hyg. **10**, 759—766 (1961).

[10] Klein, M.: The significance of human antiviral neutralizing substances in animal sera. Ann. N. Y. Acad. Sci. **70**, 362—368 (1958).

[11] Lépine, P., J. Samaille, J. Maurin, O. Dubois et M. C. Carré: Isolement du virus Echo 14 au cours d'une épidémie crêche de gastro-entéritis. Ann. Inst. Pasteur **99**, 161—166 (1960).

[12] McNair Scott, T. F.: Clinical syndromes associated with entero virus and Reo virus infections. Advances in Virus Research, Vol. 8, p. 165—197. New York: Acad. Press 1961.

[13] Melnick, J. L.: Problems associated with viral identification and classification in 1956. Ann. N. Y. Acad. Sci. **67**, 363—382 (1957).

[14] Moscovici, C., A. Ginevri e V. Mazzaracchio: Isolamento tu coltura di tessuti di un virus da enterite suina. Zooprofilassi **11**, 417—423 (1956).

[15] Newa, F. A., and M. F. Malone: Persistence of antibodies to Echo 16 viruses following Boston exanthem disease. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **102**, 233 to 235 (1959).

[16] Ormsbee, R. A., and J. L. Melnick: Biologic and serologic characteristics of Echo viruses from West Virginia. J. Immunol. **79**, 384—392 (1957).

[17] Philipson, L.: Association between a recently isolated virus and an epidemic of upper respiratory disease in a day nursery. Arch. ges. Virusforsch. **8**, 204—215 (1958).

[18] Philipson, L.: Experiments in human adults with a recently isolated virus associated with respiratory disease. Arch. ges. Virusforsch. **8**, 318—331 (1958).

[19] Ramos-Alvarez, M.: Cytopathogenic enteric viruses associated with undifferentiated diarrheal syndromes in early childhood. Ann. N. Y. Acad. Sci. **67**, 326—331 (1957).

[20] Ramos-Alvarez, M., and A. B. Sabin: Characteristics of poliomyelitis and other viruses recovered in tissue culture from healthy american children. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **87**, 655—661 (1954).

[21] Ramos-Alvarez, M., and A. B. Sabin: Intestinal viral flora of healthy children demonstrable by monkey kidney tissue culture. Amer. J. publ. Hlth **46**, 295—299 (1956).

[22] Ramos-Alvarez, M., and A. B. Sabin: Enteropathogenic viruses and bacteria. Role in summer diarrheal diseases of infancy and early childhood. J. Amer. med. Ass. **167**, 147—156 (1958).

[23] Reed, L. J., and H. Muench: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Amer. J. Hyg. **27**, 493—497 (1938).

[24] Rosen, L., J. H. Johnson, R. J. Huebner and J. A. Bell: zit. in: Melnick, J. L., and A. B. Sabin: The Echo virus group. In: Rivers, Th. M., and F. L. Horsfall jr.: Viral and Rickettsial Infections of Man, p. 556. Philadelphia: J. B. Lippincott Co. 1959.

[25] Wenner, H. A.: Echo-Viren. Ein Überblick über ihre Natur und derzeitige Bedeutung in der klinischen Medizin. Klin. Wschr. **37**, 313—325 (1959).

[26] Wigand, R.: Schwierigkeiten bei der Neutralisation von Enteroviren. Zbl. Bakt., I. Abt. Abt. Orig. **177**, 504—517 (1960).

Oberarzt Dr. W. Henigst,
Staatl. Bakteriologische Untersuchungsanstalt, 8 München 2, Lazarettstraße 60

Zeitschrift f. Hygiene 148, 565—581 (1962)

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk)

Beziehung zwischen Substanzgehalt und Präcipitationstiter in Abhängigkeit von einigen Herstellungsfaktoren bei Fuller-Antigenen *

Von
S. Grund und H.-G. Hilliger

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. August 1962)

Grampositive Bakterien haben die Neigung, in physiologischer Kochsalzlösung zu autoagglutinieren. Bei serologischen Antigenanalysen des Corynebacteriums (C.) pyogenes mittels der Agglutination gelang es uns bislang nicht, diese unliebsame Eigenschaft zuverlässig auszuschließen (Hartwigk u. Grund). Wir versuchten daher, durch die Präcipitation mit Verdünnung der Extrakte (β-Präcipitation) über die antigenen Beziehungen verschiedener Stämme Aufschluß zu erlangen. Unsere Untersuchungen zeigten aber, daß gleichhohe Titer der quantitativen Präcipitation auch bei Verwendung eines gleichen Serums nicht unbedingt als Ausdruck einer nahen Antigenverwandtschaft angesehen werden können. Die Titerhöhe wurde so wesentlich durch den Substanzgehalt der Antigene, der beachtlich variieren kann, beeinflußt, daß der Titer allein nur bedingt als Ausdruck der spezifischen Wertigkeit angesehen werden kann.

Als Substanzgehalt eines Antigens wird in dieser Arbeit der mit der Ultrazentrifuge, also quantitativ, ermittelte Gesamtgehalt aller im Lösungsmittel gelöster oder suspendierter Stoffe bakterieller Herkunft bezeichnet, und zwar unabhängig von der chemischen Zusammensetzung und biologischen Wirksamkeit. Der Substanzgehalt wird in Gramm pro 100 ml Lösungsmittel (g-%) angegeben.

Selbst bei gleichartiger Herstellungstechnik gelang es uns nur selten, von einem Stamm mehrere Fuller-Antigenchargen herzustellen, die einerseits einen annähernd gleichhohen Substanzgehalt und andererseits eine etwa einheitliche serologische Aktivität zeigten. Diese Inkonstanz zeigte sich beim Vergleich von Antigenen verschiedener Stämme noch ausgeprägter. Es wurde daher versucht, den Substanzgehalt der verwendungsbereiten Fuller-Extrakte durch den nach Philpot-Svensson

* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Untersuchungen.

mit Hilfe der Ultrazentrifuge sichtbar gemachten Konzentrationsgradienten zu ermitteln. Durch Gegenüberstellung von Titer und Substanzgehalt wurde zu klären angestrebt, welche Beziehung zwischen diesen beiden Werten besteht, welchen Einfluß einige Herstellungsfaktoren auf diese Beziehung haben und welche Möglichkeiten bestehen, bei Vergleichen die Aussagekraft eines serologischen Titers zu verbessern.

Material

Von 15 verschiedenen Bakterienstämmen wurden Fuller-Antigene gewonnen. Es handelte sich um folgende bovine Stämme:

1. 4 C. pyogenes (C.p.)-Stämme, davon

a) 3 typische C.p.-Stämme: den aus einer eitrigen Endometritis isolierten Stamm 56, den aus einer klinisch gesunden Vagina gewonnenen Stamm Pyo 55 sowie den uns von einem anderen Institut überlassenen Stamm J 7;

b) 1 atypischen C.p.-Stamm G 11, der mittels Geschabselprobe aus dem Uterus eines Schlachtrindes isoliert worden war.

2. 4 β-hämolytische, nicht differenzierbare Corynebakterienstämme: XIII/7, 589/3, IX/1 und Tu XIV/2.

Während die ersten 3 dieser Stämme aus Tupferproben klinisch gesunder Vaginen stammten, wurde der Stamm Tu XIV/2 von einer Vaginitis isoliert.

3. 3 Streptokokkenstämme: Str. 9, 10 und 11.

Die Stämme 10 und 11 wurden aus eitrigen Endometritiden, der Stamm 9 aus einer klinisch gesunden Vagina isoliert. Stamm 9 und 11 gehörten zur serologischen Gruppe C, Stamm 10 zur Gruppe A.

4. 2 Staphylokokkenstämme: Sta. 12 und 13.

Beides waren β-hämolytische Staphylococcus albus-Stämme, der Stamm Sta. 12 wurde aus einer gesunden Vagina und der Stamm Sta. 13 aus einer eitrigen Endometritis gezüchtet.

5. 2 Escherichia coli-Stämme: Co. 14 und 15.

Der hämolytische Stamm 14 stammte aus einer eitrigen Endometritis, der Stamm 15 aus einer klinisch gesunden Vagina.

Die biochemischen und kulturellen Merkmale der 15 Stämme sind aus der Tab. 1 ersichtlich. Die biochemische Differenzierung wurde unmittelbar nach der Isolierung durchgeführt und kurz vor der Antigenherstellung wiederholt, wobei die Ergebnisse übereinstimmten.

Methodik

Gewinnung des Antigens

Die Stämme wurden auf Frischblutplatten kultiviert und bis zur serologischen Differenzierung in vierwöchigen Intervallen überimpft. Zur Gewinnung der Fuller-Antigene wurden die Keime zunächst von Blutplattenkulturen in Röhrchen mit 1% iger Traubenzuckerbouillon überimpft, die 2 Tage lang in CO_2-Atmosphäre bei 37,5° C bebrütet wurden. Der durch Zentrifugation gewonnene Bodensatz von drei Röhrchen wurde in 200 ml Nährbouillon übertragen, wobei zur kulturellen Reinheitskontrolle ein Tropfen des Bodensatzes auf Blutplatten überimpft wurde. Die Kolben wurden 1—1½ Tage in CO_2-Atmosphäre gehalten. Das dabei erzielte Keimwachstum war trotz annähernd gleicher Einimpfmenge, makroskopisch beurteilt, oft unterschiedlich. Die Keime wurden 20 min bei 4000 U/min aus dem Nährmedium

Tabelle 1

Stämme	Hämolyse	Lackmusmilch	Gelatineverfl.	Katalase	Glucose	Lactose	Saccharose	Maltose	Raffinose	Galaktose	Inulin	Salicin	Laevulose	Stärke	Trehalose
J 7	β	Gerinnung, Rötung, Redukt. Pepton	−	−	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−
Pyo 55	β	Gerinnung, Rötung, Redukt. Pepton	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+
56	β	Gerinnung, Rötung, Redukt. Pepton	+	−	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+
G 11	β	Gerinnung, Rötung	−	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	+
XIII/7	β	Gerinnung, Rötung, Redukt. Pepton	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+
589/3	β	unverändert	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
Tu XIV/2	β	unverändert	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
IX/1	β	Gerinnung, Rötung	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
Str. 9	β	schwache Rötung	−	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	+
Str. 10	vergrünend	schwache Rötung	−	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+
Str. 11	schw. β		−	−	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−
Sta. 12	β	Redukt. am Boden, schw. Rötung, Gerinnung	+	+	−	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+
Sta. 13	β	Gerinnung, Rötung, Reduktion	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+
Coli 14	hämolyt.	Gerinnung, Reduktion	−	±	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+
Coli 15	anhämolyt.	Gerinnung, Reduktion beg.	−	±	+	+	−	+	−	+	−	−	+	−	+

abzentrifugiert. Die Überprüfung der Reinheit erfolgte kulturell auf der Blutplatte oder bakterioskopisch. Nach zweimaliger Waschung in physiologischer NaCl-Lösung wurde der Bodensatz zunächst in 4,5 ml Formamid/Kolben im Ölbad bei 160° während ca. 20 min gelöst, dann durch Zusatz von 2,5 ml HCl-Alkohol gefällt und 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der dekantierte Überstand wurde mit Aceton bis zum Auftreten einer deutlichen Trübung versetzt (ca. 30 ml Aceton pro Kolben) und nach einer Einwirkungsdauer von 5 min bei 4500 U/min 10 min lang zentrifugiert. Der Bodensatz wurde nach Abgießen des Überstandes in physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen. Die Menge der zur Eluierung der Acetonfällung verwendeten physiologischen NaCl-Lösung betrug im Durchschnitt 3 ml pro Kolben, mußte aber bei schwachem Keimwachstum zuweilen verringert werden. Die Bestimmung der Bodensatzmenge erfolgte visuell in Zentrifugenspitzgläsern gleicher Größe. Die Eluationszeit betrug ca. 1 Std. Sie wurde im Interesse möglichst reproduzierbarer Herstellungsbedingungen eingehalten, obwohl mitunter ein Rückstand ungelöst blieb. Durch Zentrifugation und Dekantieren wurden die im Überstand gelösten Polysaccharide nach einem 12 stündigen Kühlschrankaufenthalt von den schwerer löslichen Substanzen des Bodensatzes getrennt. Ein Teil des Bodensatzes konnte durch verlängerte Eluationszeiten gelöst werden. In der Präcipitation erwies sich diese Fraktion jedoch als inaktiv.

Der p_H-Wert wurde durch 1%iges Natriumcarbonat mit Hilfe von Indicatorpapier (Merck) auf p_H 7,0 eingestellt.

Präcipitation

Bei der Präcipitation wurden 0,1 ml Serum mit 0,1 ml Fuller-Extraktverdünnung in Uhlenhuth-Röhrchen überschichtet. Es kamen jeweils die Verdünnungen 1:1; 1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:600; 1:800; 1:900; 1:1000; 1:1100; 1:1200; 1:2400 zum Ansatz. Die Ablesungen erfolgten in verschiedenen Zeitabständen, jedoch wurde für die Bewertung stets der 30 min-Wert zugrunde gelegt. Bei jeder neuen Fuller-Antigencharge wurde ein Kontrollröhrchen mit Normalserum angesetzt.

Als spezifisches Standard-Antiserum diente unser Serum K 90. Dasselbe war mit dem Stamm C. pyogenes 56 von Kaninchen gewonnen worden und präcipitierte mit C. pyogenes-Antigenen, besonders mit denen, die eine größere Substanzkonzentration aufwiesen, bis zu hohen Verdünnungsstufen (bis 1:1000).

Die Immunisierung des Kaninchens geschah durch zwölfmalige i.v. Injektion von 1—3 ml eines Kochantigens in 3 tägigen Intervallen. Das Antigen wurde durch Abschwemmung von 48stündigen Frischblutplattenkulturen mit 3,0 ml phyisologischer NaCl-Lösung je Platte gewonnen, die Abschwemmung $^1/_2$ Std bei 12000 U/min in der Kühlzentrifuge bei + 8° C zentrifugiert, der Bodensatz dreimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, im Verhältnis 0,3 ml pro Platte in physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen und 1 Std im Dampftopf erhitzt. Die Sterilität des Inoculums wurde durch Kultivierung auf Blutplatten überprüft.

Das durch Entbluten des Kaninchens unter sterilen Kautelen gewonnene Serum wurde in Mengen von 0,5 und 1 ml lyophilisiert und bis zum Verbrauch im Kühlschrank bis zu einem $^3/_4$ Jahr vorrätig gehalten.

Ultrazentrifugation

Der in der Ultrazentrifuge mit Hilfe der Philpot-Svensson-Optik sichtbare Gradient ist ein Konzentrationsgradient, wie er in Abb. 1 dar-

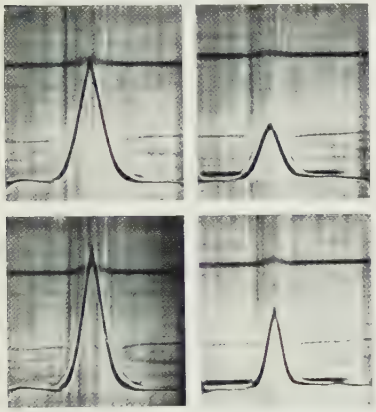


Abb. 1

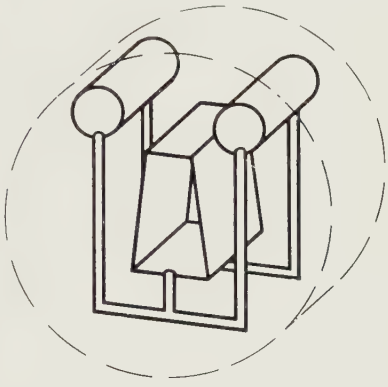
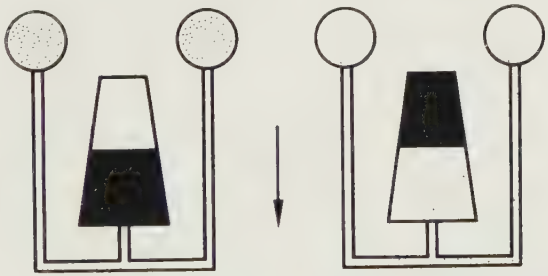


Abb. 2

Abb. 1. Konzentrationsgradienten nach PHILPOT-SVENSSON von zwei Fuller-Antigenen, dargestellt mit Hilfe der Ultrazentrifuge in der Unterschichtungszelle. *Links.* Antigen I mit 1,26 g-% Substanzgehalt; *unten* nach 155″ Laufzeit bei 5000 U/min.; *oben* nach 215″ Laufzeit bei 7000 U/min. *Rechts.* Antigen II mit 0,52 g-% Substanzgehalt; *unten* nach 90″ Laufzeit bei 2000 U/min; *oben* nach 165″ Laufzeit bei 5000 U/min

Abb. 2. Schematische Zeichnung der Meyerhoffschen Unterschichtungszelle[1]



a vor b nach der Unterschichtung

Abb. 3. Schematische Darstellung des Unterschichtungsvorganges in der Meyerhoff-Zelle[1]

gestellt ist, der vorwiegend qualitativ, d. h. auf die Wanderungsgeschwindigkeit der gelösten Substanz im benutzten Schwerefeld, geprüft wird.

[1] Die Abb. 2 und 3 wurden mit Genehmigung des Verfassers entnommen aus der Arbeit von G. OLTMANN: „Erweiterung des Meßbereiches der PHYWE-Ultrazentrifugen auf niedrige Molekulargewichte". PHYWE-Mitteilungen U 306.

Bei dem Ziel, einen Vergleichsmaßstab für eine biologische Reaktion zu finden, stellten wir die quantitative Untersuchung in denVordergrund. Der Konzentrationsgradient ist im Idealfall eine Gaußsche Glockenkurve. Die Fläche unter der Gaußkurve ist der Konzentration der gelösten Substanz proportional.

In der normalen analytischen Meßzelle der Ultrazentrifuge tritt von gelösten Stoffen dann ein Gradient auf, wenn die Stoffe im benutzten Schwerefeld sedimentieren. Bei der maximal mit der Phywe-Ultrazentrifuge erreichbaren Rotorgeschwindigkeit von 50000 U/min (= 180000 g) können nur solche Substanzen meßbar zur Sedimentation gezwungen werden, die ein Molekulargewicht von über 12000 besitzen (Meyerhoff). Für die hier geprüften Fuller-Antigene gelang eine Gradientenbildung während einer Zentrifugationsdauer von 160 min bei 50000 U/min in der normalen Meßzelle nicht. Mit der von Meyerhoff entwickelten Unterschichtungszelle läßt sich eine künstliche Grenzschicht bilden und damit auch von Substanzen mit Molekulargewichten von unter 12000 ein Konzentrationsgradient sichtbar machen.

Das Prinzip der Meyerhoff-Zelle ist aus Abb. 2 und 3 zu ersehen. Die Meßzelle (siehe Abb. 2) besteht aus drei Kammern, die jeweils durch nicht abgebildete, druckdicht verschraubbare Bohrungen gefüllt werden können. Die eingezeichneten Kanäle, die die Kammern verbinden, sind so eng, daß bei ruhender Zelle kein Austausch zwischen den Kammern stattfinden kann. Die beiden zylindrischen Kammern werden mit der zu untersuchenden Substanz und die sektorförmige Mittelkammer etwa zur Hälfte mit dem Lösungsmittel gefüllt (Abb. 3a). Die Zelle wird so in den Rotor eingesetzt, daß der in den Abbildungen unten liegende Teil der Zelle an der Rotoraußenkante, also rotationszentrumfern, liegt. Mit dem Anfahren der Zentrifuge treibt die wachsende Zentrifugalkraft die Flüssigkeit aus den zylindrischen Kammern durch die eingezeichneten Kanäle von unten in die Mittelkammer, so daß in der Mittelkammer zwischen dem dort vorhandenen Lösungsmittel und der hinzutretenden Flüssigkeit eine künstliche Grenzschicht entsteht, die zunächst am Boden zu beobachten ist, dann durch den Zutritt weiterer Flüssigkeit nach oben wandert und schließlich etwa in der Mitte liegt (Abb. 3b). Bei vorsichtiger Unterschichtung bildet sich an der Grenzschicht ein in seiner Breite und Höhe von der Diffusion abhängiger Gradient, der meßtechnisch ausgewertet werden kann (Höfle; Hilliger). Die Diffusion findet ihren Ausdruck in der zwar unterschiedlich raschen, aber ständigen Abnahme der Höhe des Gradienten; dieser Abnahme geht eine Verbreiterung des Gradienten parallel. Bei gleichen Beobachtungsbedingungen sind die Flächen unter solchen unterschiedlich geformten Gradienten, die stets den Charakter einer Gaußschen Glockenkurve besitzen, während eines Versuches gleich.

Diese Darstellungsart eines Gradienten wird in ähnlicher Form auch bei rein statisch arbeitenden Diffusionseinrichtungen verwendet. Die beschriebene Meyerhoffsche Unterschichtungszelle hat jedoch gegenüber

der Diffusionsmeßzelle den großen Vorteil, daß sie mit einer Füllmenge von 0,2 ml der zu prüfenden Substanz auskommt, während eine Diffusionsmeßzelle etwa 2,0 ml erfordert. Dieser Minderbedarf bedeutet für die oft nur in geringen Mengen verfügbaren Fuller-Antigene einen sehr wesentlichen Vorteil.

Die Antigene wurden bei einer Temperatur zwischen 20,0 und 24,0° C unter physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl, p_H 7,4; 0,15 molar) geschichtet. Es wurde ein Treibdruck von 1—2 atü angewendet. Die Unterschichtung erfolgte bei einer Rotorgeschwindigkeit von 800—1200 U/min. Die maximale Tourenzahl betrug zunächst 30000 U/min und wurde dann auf 10000 U/min herabgesetzt. Von jedem Antigen und von der benutzten Kochsalzlösung machten wir in der Regel binnen 5 min mindestens vier Aufnahmen bei einem je nach Gradientengröße gewählten Philpot-Winkel von 30, 45 und 60°. Bei Prüfung mehrerer Antigene wurden für jeden Versuch einschließlich Vorbereitung der Zellen 15 bis 20 min benötigt.

Die Auswertung der Gradienten erfolgte unter dem Leitz-Meßmikroskop durch Messung der Gradientenhöhe und der Breite des Gradienten in halber Höhe. Aus diesen Werten wurde die Fläche nach dem von Höfle angegebenen Verfahren errechnet. Bei gleichem Philpot-Winkel ergab sich für jeweils ein Antigen eine Abweichung zwischen den mindestens drei Einzelmessungen von $\pm 10\%$ der Gradientenfläche. Durch Multiplikation mit einem experimentell ermittelten Proportionalitätsfaktor ergab sich aus der Gradientenfläche der tatsächliche Substanzgehalt in Gramm pro 100 ml Flüssigkeit (g-%). Unberücksichtigt bei der Auswertung blieben Temperaturunterschiede des Rotors und Unterschiede bei der Lage des Gradientenmaximums, wie sie sich durch unterschiedliche Kammerfüllung in geringem Grade ergaben.

Eiweißbestimmung

Die Eiweißbestimmung erfolgte zur qualitativen Ergänzung der quantitativen Ultrazentrifugation durch die Biuret-Probe. Die Biuret-Probe wurde nach der von Weichselbaum sowie von Frank u. Koecher beschriebenen Methode mit Hilfe des Photometers „Eppendorf" durchgeführt. Hierzu wurden abweichend von der gebräuchlichen Methode nicht 5 ml Serumverdünnung (1:50) mit 5 ml Reagens, sondern nur 2 ml unverdünntes Fuller-Antigen mit 2 ml Biuret-Reagens in einem Reagensglas gemischt. Als Bezugswert diente eine Mischung von 2 ml Biuret-Reagens mit 2 ml physiologischer NaCl-Lösung. Nach einer halbstündigen Aufbewahrung der Lösungen bei Zimmertemperatur wurde die Extinktion mit einer Schichtdicke von 20 mm bei 546 mμ gegen den Bezugswert gemessen.

Die Berechnung des Eiweißgehaltes erfolgte nach der Formel

$$E \cdot \frac{16{,}5}{50} = \text{g-\% Eiweiß.}$$

Hierbei ist E der gemessene Extinktionswert. Der Faktor 16,5 wurde experimentell an Mischseren mit Hilfe der Eiweißbestimmung nach Kjeldahl überprüft. Der

Nenner von 50 ergibt sich daraus, daß wir anstatt mit der gebräuchlichen Serumverdünnung von 1:50, nämlich 0,1 ml Serum + 4,9 ml physiologische NaCl-Lösung, mit dem unverdünnten Fuller-Antigen arbeiteten. Die Originalkonzentration des Fuller-Antigens mußte wegen des geringen Substanzgehaltes verwendet werden.

Ergebnisse

Beziehung zwischen Titer und Substanzgehalt

Vom C. pyogenes-Stamm J 7 wurden mehrere Fuller-Antigenchargen mit vorsätzlich unterschiedlichem Substanzgehalt hergestellt und mittels Präcipitation ausgewertet. Die reziproken Titer und der Substanzgehalt wurden in Tab. 2 (Charge 1—6) einander gegenübergestellt.

Tabelle 2. *Präcipitationstiter und Substanzgehalt von neun Antigenchargen des C. pyogenes-Stammes J 7*

	Traubenzuckerbouillon-Kultur (Bo.)						Blutagar-Kultur (Bl.)		
Chargennummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Reziproker Präcipitationstiter	25	100	200	400	400	600	100	800	1000
Substanzgehalt in g-%	0,7	1,1	1,3	2,2	4,1	5,1	0,5	1,8	3,8

Aus den Ergebnissen der Traubenzuckerbouillon-Antigenchargen 1—6 ist ersichtlich, daß die Höhe des Präcipitationstiters mit zunehmendem Substanzgehalt wächst. Diese Beziehung ist jedoch, wie in Abb. 4 zu erkennen ist (Kurvenzug A), nicht linear, sondern zeigt die Form einer Kurve: Bei steigendem Substanzgehalt strebt der Titer nach einem steilen Anstieg, der in der Abbildung als fast waagerecht verlaufende Linie zu erkennen ist, einer definierten Maximalhöhe, die bei diesem Stamm bei 1:800 liegt, zu.

Titer und Kulturmediumart

Wie stark das Präcipitationsergebnis von der Art des Nährbodens beeinflußt werden kann, wurde mit Hilfe von drei weiteren Antigenchargen (Nr. 7—9, Tab. 2) desselben Stammes überprüft. Diese Chargen wurden aus Keimen gewonnen, die nicht in Traubenzuckerbouillon (Bo.), sondern auf Frischblutagarplatten (Bl.) kultiviert worden waren. Bei diesen Antigenen (Bl.) erreichte die Charge 7 mit dem Substanzgehalt von 0,5 g-% einen Titer von 1:100, während die Bouillon-Antigencharge 1 mit dem vergleichbaren Substanzgehalt von 0,7 g-% nur einen Titer von 1:25 aufwies. Bei einem Substanzgehalt von 1,8 g-% (Nr. 8) wurde ein Titer von 1:800 erzielt, dem der Titer 1:400 bei einem Bo.-Antigen (Nr. 4) mit dem höheren Substanzgehalt von 2,2 g-% gegenüberstand.

Trägt man die Werte der Bl.-Antigene ebenfalls in ein Koordinatensystem ein (Abb. 4, Kurvenzug B), so läßt sich eine dem vorangegangenen

Versuch im Prinzip entsprechende Abhängigkeit erkennen. Jedoch zeigt sich, daß bei vergleichbarem Substanzgehalt die erzielten Titer der über die Blutplatte gewonnenen Antigene sowie der zu vermutende Maximaltiter etwa doppelt so hoch liegen wie bei den über die Traubenzuckerbouillon gewonnenen Antigenen. Bei Kontrollpräcipitationen mit einem

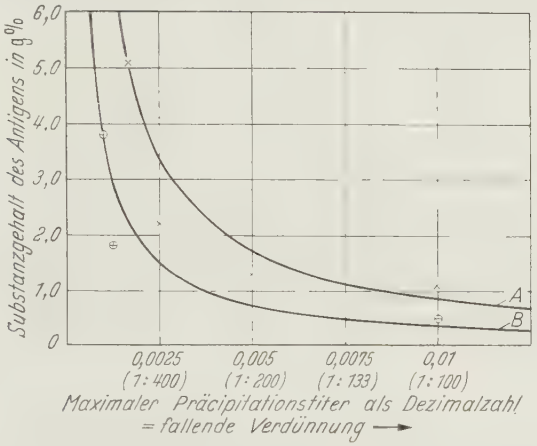


Abb. 4. Graphische Darstellung der Beziehung der in Tab. 2 zusammengestellten Werte von Titer und Substanzgehalt von Fuller-Antigenen. Die Meßpunkte der über die Traubenzuckerbouillon gewonnenen Antigene (Gruppe 1 = Charge 2—6) sind durch ein einfaches Kreuz, die der über die Blutplatte gewonnenen Antigene (Gruppe 2 = Charge 7—9) durch ein Kreuz im Kreis gekennzeichnet. Für beide Versuchsgruppen wurde die zugehörige Hyperbel als ausgezogene Linie eingezeichnet

normalen Kaninchenserum erwiesen sich alle Antigenchargen negativ; lediglich das Bl.-Antigen (Charge 9) mit einem Substanzgehalt von 3,8 g-% zeigte in der Ausgangskonzentration nach 2 Std eine schwache Ringbildung.

Eiweißanteil am Substanzgehalt

Ob und in welchem Maße die Erfassungsgenauigkeit dieser Abhängigkeit durch einen wechselnden Gehalt der Fuller-Antigene an serologisch inaktiven Substanzen begrenzt wird, sollte durch Ermittlung des Eiweißgehaltes geklärt werden. Der mittels der Biuret-Probe festgestellte Eiweißgehalt wurde zu dem durch die Ultrazentrifugation ermittelten Substanzgehalt in Beziehung gesetzt und dann in Prozenten als relativer Eiweißanteil bezeichnet. Diese so erhaltenen Werte können nur zu Vergleichszwecken dienen, da die Ergebnisse der Biuret-Probe einerseits trotz des konzentrierten Ansatzes unterhalb des üblichen Anwendungsbereiches liegen und andererseits die Spezifität dieser Probe, insbesondere beim Vorliegen von Eiweißabbauprodukten, nicht sehr hoch gewertet werden darf. Der zwischen 0,72 und 0,87 % schwankende relative Eiweißanteil deutet darauf hin, daß es bei gleichem Stamm (J 7) und mit einer

weitgehend gleichartigen Herstellungstechnik, vor allem bei gleicher Nährbodenverwendung, möglich ist, einen relativ konstanten Eiweißanteil zu erzielen (siehe Tab. 3).

Tabelle 3. *J 7-Fuller-Antigene aus Traubenzuckerbouillonkulturen*

Gesamtsubstanzgehalt in g-%	0,7	1,29	2,2
absoluter Eiweißgehalt in g-%	0,00528	0,00957	0,0193
Relativer Eiweißanteil in Prozent	0,72	0,73	0,87

p_H-Wert und Präcipitationsergebnis

Bei allen Präcipitationen wurde der p_H-Wert der Fuller-Antigene auf p_H 7,0 eingestellt. Ein Abweichen vom Neutralpunkt hatte auf das Präcipitationsergebnis einen erheblichen Einfluß (siehe Tab. 4).

Tabelle 4. *Präcipitationstiter und p_H-Wert*

	Antiserum K 90					Normalserum	
	C.p. Pyo 55			C.p. G 11		C.p. Pyo 55	C.p. G 11
p_H-Wert	7,0	7,3	6,2	7	7,4	9	9
Substanzgehalt in g-%	1,4	0,8		0,6		0,8	0,6
reziproker Titer	100	100	1+	200	400	400	400

Eine Antigencharge des Stammes Pyo 55 mit einem Substanzgehalt von 1,4 g-% und dem p_H-Wert von 7,0 ergab den Titer von 1:100. Der gleiche Titer ließ sich mit einer Charge, die 0,8 g-% Substanz enthielt und auf p_H 7,3 eingestellt wurde, erzielen. Wurde der p_H-Wert mit HCl auf 6,2 reduziert, trat lediglich im unverdünnten Zustand ein schwacher Präcipitationsring auf.

Bei einem Antigen des Stammes G 11 mit einem Substanzgehalt von 0,6 g-% kam es bei p_H 7,0 zu einer Ringbildung bis zur Verdünnung von 1:200; der Titer erhöhte sich auf 1:400 bei einem p_H von 7,4. Mit Kaninchennormalserum reagierten beide Antigene negativ.

Bei einem p_H von 9,0 traten bei den Antigenen der Stämme G 11 und Pyo 55 mit 15 Normalseren von Kaninchen in der Ausgangskonzentration bereits nach 3—5 min deutliche Ringbildungen auf. Nach 30 min waren auch bei höheren Verdünnungen, durchschnittlich bis 1:400, Präcipitationen zu beobachten, wobei geringe Unterschiede in der Höhe der Titer vorkamen.

Titerunterschiede bei verschiedenen Bakterienstämmen

Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Entsprechend der Höhe der Präcipitationstiter kann zwischen den typischen C. pyogenes-Stämmen 56, Pyo 55 und J 7 und dem atypischen C. pyogenes-Stamm G 11 eine Antigenverwandtschaft angenommen werden. Bei homologem Serum (C. p. 56) kam es bei einem Substanzgehalt von 0,91 g-% bei dem Stamm 56 nur zu einem Titer von 1:50. Diesem

Tabelle 5

Stämme	Klassifizierung		Substanzgehalt in g-% (Ultrazentrif.)	Reziproker Präcipitationstiter	„Eiweiß" in g-% (nach BIURET)	Relativer „Eiweiß"-anteil in %
J 7			1,29	200	0,00957	0,7
Pyo 55	C. pyogenes typisch		1,35	100	0,0198	1,5
56			0,91	50	0,01485	1,6
G 11	C. pyogenes atypisch		0,56	200	0,01023	1,8
XIII/7			2,44	1	—	—
589/3	hämolytische		1,07	—	0,01056	0,9
Tu XIV/2	Corynebakterien		0,53	—	—	—
IX/1			2,8	—	—	—
Str. 9		Gruppe C	0,6	1	0,0156	1,7
Str. 10	Streptokokken	Gruppe A	0,53	—	0,010065	1,9
Str. 11		Gruppe C	1,33	1	0,0330	2,5
Sta. 12	Staphylo-	albus	1,00	1	0,0891	8,9
Sta. 13	kokken	aureus	1,27	1	0,0957	7,5
Coli 14	E. coli		0,47	—	0,0528	11,3
Coli 15			0,62	1	0,04125	6,7

Titer standen bei Antigenen aus heterologen Stämmen mit Substanzgehalten von 1,35 und 1,29 g-% Titer von 1:100 (Pyo 55) und 1:200 (J 7) gegenüber. Der atypische C. pyogenes-Stamm G 11 erreichte, obwohl der Substanzgehalt mit 0,25 g-% am niedrigsten lag, sogar einen Titer von 1:200. Auf diese Ergebnisse, die zunächst angesichts der Tatsache, daß die Unterschiedlichkeit des Substanzgehaltes keine hinreichende Erklärung für die unterschiedlichen Titer gibt, paradox erscheinen, wird in der Besprechung noch zurückzukommen sein. Bei Antigenen aus den Stämmen XIII/7, 589/3, Tu XIV/2, IX/1, deren Kolonieform, Morphologie und Hämolyseart zwar der Familie Corynebacteriaceae entsprach, die aber auf Grund einiger biochemischer Besonderheiten (siehe Tab. 1) nicht der Species C. pyogenes zugeordnet werden konnten, fiel die Präcipitation trotz vergleichbarer Substanzgehalte negativ oder in der Originalstufe 1:1 schwach positiv aus.

Ebenfalls schwach positiv oder negativ zeigten sich Extrakte aus Streptokokken-, Staphylokokken- und Colistämmen.

Der relative Eiweißgehalt unterlag bei den Antigenen der verschiedenen Stämme erheblichen Schwankungen. Bei den Staphylokokken (Sta. 12 und 13) betrug er 8,9 und 7,5%, bei den Colistämmen 11,3% (Co 14) und 6,7% (Co 15). Demgegenüber lag der relative Eiweißgehalt bei den Streptokokken und den Corynebakterien-Antigenen zwischen 0,7 und 2,5%.

Lagerungsstabilität der serologisch aktiven Substanzen

Bei Fuller-Extrakten, die $^1/_2$ Jahr im Kühlschrank aufbewahrt worden waren, hatten sich Bodensätze gebildet. Die nochmalige Prüfung des Überstandes mittels Präcipitation ergab gleichhohe Titer, wie sie mit dem frisch hergestellten Antigen erzielt worden waren, so daß die Bodensätze vermutlich aus serologisch inaktiven Substanzen bestehen. Bakteriell verunreinigte Antigene können auch bei nur sehr geringer Trübung zu erheblichen Irrtümern führen, da sie bis zu hohen Titern präcipitiert wurden. Um die Verunreinigungsgefahr zu verringern, wurde geprüft, inwieweit die Lyophilisation eine Bevorratung ermöglicht. Nach 6monatiger Aufbewahrung lyophilisierter Antigene erwiesen sich diese nach Resuspendierung mit Aqua dest. als voll wirksam. Die Reproduzierbarkeit des Präcipitationsergebnisses hing in erster Linie von einer sehr genauen Abmessung des Lösungsmittels ab.

Für serologisch standardisierte Fuller-Antigene kann der Lyophilisation eine erhebliche Bedeutung zuerkannt werden.

Besprechung

Die Präcipitation stellt üblicherweise ein qualitatives Verfahren dar. Die Genauigkeit quantitativer Präcipitationsergebnisse hängt von mehreren Faktoren ab. Die Berücksichtigung des *Substanzgehalts* von Antigenen ermöglicht einen besseren Vergleich der Ergebnisse dieses empfindlichen serologischen Verfahrens.

Chemische Bestimmungsverfahren der in den Antigenen enthaltenen Substanzen sind aufwendig und schwierig. Deshalb bestimmten wir die Substanzgehalte des gebrauchsfertigen Antigens mittels der Ultrazentrifuge. Die Ultrazentrifugation bietet den Vorteil, daß nur eine geringe Antigenmenge (0,2 ml) zur Prüfung erforderlich ist. Ein wechselnder Anteil serologisch inaktiver Substanzen am Gesamtsubstanzgehalt begrenzt die Erfassungsgenauigkeit dieser quantitativ physikalischen Methode. Im Hinblick hierauf wurden Fuller-Extrakte als Präcipitinogene verwendet, da dieses Verfahren uns die Aussicht zu bieten schien, einen erheblichen Anteil an unspezifischen Substanzen zu eliminieren.

An neun Antigenchargen eines C. pyogenes-Stammes (J 7), die einen unterschiedlichen Substanzgehalt hatten, wurde durch Vergleich deutlich, daß ein höherer Substanzgehalt eine Erhöhung des Titers zur Folge hatte. Die Art dieser Beziehung ist an Hand der graphischen Darstellung in

Abb. 4 zu erkennen. Die Werte stehen in keiner linearen Beziehung zueinander. Vielmehr ergibt sich ein Kurvenzug mit einem fast geradlinigen steilen Abfall, der dann über einen kreisabschnittähnlichen Scheitel führt und schließlich in einem fast geradlinigen und etwa waagerechten Schenkel ausläuft. Exponentialfunktionen und Hyperbeln ergeben einen derartigen Kurvenverlauf.

Da das Eintragen der Titerwerte im logarithmischen Maßstab keine Gerade ergab, ist das Vorliegen einer Exponentialfunktion auszuschließen. Bei der Hyperbel stehen die Abszissen- und Ordinatenwerte für jeden Kurvenpunkt in Beziehung durch die Gleichung

$$y = \frac{1}{x} \cdot a,$$

wobei a ein der jeweiligen Kurve eigener konstanter Faktor ist. Mit Hilfe dieser Formel ist eine Überprüfung des Hyperbelcharakters dadurch möglich, daß man jeden y-Wert mit dem dazugehörigen x-Wert multipliziert, im vorliegenden Falle also das Produkt aus Titer und Substanzgehalt bildet. Beim Vorliegen einer hyperbelartigen Abhängigkeit hat dieses Produkt der einzelnen Kurvenpunkte stets die Größe des konstanten Faktors a.

Für die in Tab. 2 aufgeführten sechs Antigenchargen ergibt die Berechnung des Faktors a folgende Werte:

	Faktor a	Abweichung in Prozent vom Mittelwert aus Charge 2—6
Charge 1	0,0280	+233
Charge 2	0,0110	+ 31
Charge 3	0,0065	− 23
Charge 4	0,0055	− 35
Charge 5	0,0105	+ 25
Charge 6	0,0085	+ 1
Mittelwert aus Charge 2—6	= 0,0084	± 23

Die Übereinstimmung der Faktorgrößen zwischen den Chargen 2 bis 6 kann bei der Vielzahl der Faktoren, die auf die zur Beurteilung anstehende Beziehung Einfluß haben, und bei der geringen Chargenzahl als gut bezeichnet werden. Die maximale Abweichung vom Mittelwert beträgt 35%. Der Faktor der Charge 1 dagegen fällt mit einer Abweichung von 233% vom Mittelwert deutlich aus dem Gesamtbild heraus. Eine Übereinstimmung mit dem Mittelwert läge vor, wenn der Substanzgehalt den Wert 0,21 g-% oder der Titer einen Wert 1:8 aufweisen würde. Da die Überprüfung der Auswertung des Substanzgehaltes und der Präcipitationsprotokolle keine Fehler erkennen ließ, wird vermutet, daß die Titerabstufung im Bereich des fast gradlinigen Kurvenverlaufes zu gering ist, um hier noch reproduzierbare Werte für den konstanten Faktor a erzielen zu können. Man sollte daher diese Bereiche für Berechnungen bzw. Vergleiche meiden.

Das Vorhandensein einer solchen hyperbelartigen Beziehung läßt sich auch wahrscheinlich machen, wenn man bei den drei Antigenchargen 7—9 des Stammes J 7, die über die Frischblutagarplatte gewonnen wurden, den Faktor a bestimmt:

	Faktor a	Abweichung in Prozent vom Mittelwert
Charge 7	0,00500	+36
Charge 8	0,00225	−39
Charge 9	0,00380	+ 3
Mittelwert	0,00368	±26

Die Streuung um den Mittelwert liegt etwa in den gleichen Grenzen wie bei den Chargen 2—6. Die geringere absolute Größe des Faktors a gegenüber der Bestimmung aus dem Vorversuch wird durch eine absolut und relativ höhere Aktivität des Antigens erklärbar.

Wir möchten daher trotz des einen abweichenden Wertes annehmen, daß Titer und Substanzgehalt unter den hier zugrunde liegenden Bedingungen in Art der Funktion einer Hyperbel in folgender Beziehung zueinander stehen:

$$\text{Substanzgehalt} \cdot \text{Titer} = a,$$

wobei der Faktor a von der untersuchten Keimspecies und von der Herstellungsweise des Antigens vorwiegend abhängt.

Dieses Ergebnis ähnelt der von Heidelberger beschriebenen Abhängigkeit zwischen Antigenmenge und gebildeter Präcipitatmenge. Die Übereinstimmung wurde jedoch im einzelnen nicht überprüft, da sowohl mit anderen Keimarten als auch mit anderen Methoden gearbeitet wurde.

Die von uns gefundene übersichtliche Beziehung vermag schließlich in gewisser Weise auch eine zunächst als Arbeitshypothese aufgestellte Vermutung zu bestätigen. Das Suchen nach einer Beziehung zwischen Titer und Substanzgehalt ist nur dann berechtigt, wenn man davon ausgehen kann, daß der relative Anteil der serologisch wirksamen Substanz am Substanzgehalt etwa konstant ist. Unsere Versuche lassen es sehr wahrscheinlich erscheinen, daß diese Annahme berechtigt ist, wenn es sich um den Vergleich von Keimen einer Species bei sehr einheitlich gestalteter Antigenherstellung handelt. Einen in jedem Fall konstanten Anteil kann man nicht annehmen.

Die Prüfung des *Einflusses einiger Herstellungsfaktoren* bestätigte die hohe Empfindlichkeit der quantitativen Präcipitation. Die schwächere serologische Wirksamkeit des Antigens aus Traubenzuckerbouillonkulturen kann durch eine geringere Antigenproduktion bedingt sein. Andererseits ist denkbar, daß die festgestellte zunehmende Säuerung der Bouillonkulturen eine Lösung von „säurelöslichem Antigen" bewirkt. Dieses bei der Zentrifugation in der Bouillon verbleibende Antigen wäre aus den Keimen nicht mehr extrahierbar. Abgesehen von der Ursache ist entscheidend, daß ein wechselnder Anteil serologisch aktiver Substanzen in den gebrauchsfertigen Antigenen die Erfassungsgenauigkeit

von Präcipitinogenen durch eine quantitative Substanzbestimmung begrenzt. Deshalb ist es wichtig, die Züchtung in gleichen Nährböden durchzuführen.

Auf den Gehalt der Fuller-Extrakte von serologisch inaktiven Substanzen deuten auch die Tatsachen, daß der Überstand der $^1/_2$ Jahr im Kühlschrank aufbewahrten Antigene trotz Bildung eines Bodensatzes bis zum gleichhohen Titer, der mit dem frischen Antigen erreicht wurde, präcipitierte, sowie umgekehrt ein nach 12stündigem Kühlschrankaufenthalt abzentrifugierbarer Bodensatz nach Lösung in einer geringen Menge physiologischer NaCl-Lösung keine Präcipitation ergab.

Die Menge dieses Bodensatzes nach Kühlschrankaufenthalt läßt sich durch Verkürzung der Antigeneluationszeit verringern. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, die Fuller-Antigene weitgehend gleichartig herzustellen, also Fällungs- und Lösungszeiten genau gleichzuhalten.

Über die Chemie der serologisch inaktiven Substanzen ließ sich mittels des durch die Biuret-Methode bestimmten relativen Eiweißanteils keine Aussage machen, da die Werte weder zur Bodensatzmenge noch zum Titer in einem erkennbaren Verhältnis stehen. Der Vergleich der Werte ergab lediglich, daß die keine Präcipitation ergebenden Antigene aus Staphylokokken- und Colistämmen einen weit höheren und die im Höchstfalle ebenfalls in der Originalstufe präcipitierten Antigene der Streptokokken und Corynebakterien einen etwa gleich hohen relativen Eiweißgehalt wie die C. pyogenes-Stämme aufwiesen.

Somit schien der relative Eiweißanteil für das Ergebnis der Präcipitation nicht von erheblichem Einfluß zu sein. Für das Präcipitationsergebnis und somit für eine vergleichbare Abhängigkeit zwischen Titer und Substanzgehalt ist eine genaue Einstellung des p_H-Wertes auf den Neutralpunkt unerläßlich. Abweichungen des p_H-Wertes führen zu unspezifischen Präcipitationsergebnissen. Ein basischer p_H täuscht eine starke und ein saurer p_H eine schwache präcipitinogene Wirksamkeit vor (Tab. 4). Bei einem p_H von neun präcipitierten Fuller-Antigenen mit einem Substanzgehalt von 0,6—0,8 g-% mit Kaninchennormalseren durchschnittlich bis 1:400, während Antigene mit einem p_H von 6 weder mit Anti-, noch mit Normalseren eine Präcipitation ergaben.

Für den Vergleich der präcipitinogenen Wirksamkeit verschiedener Stämme ist die *Berücksichtigung des Substanzgehaltes* besonders interessant.

Auf Grund des Präcipitationstiters waren auch ohne Berücksichtigung des Substanzgehaltes Staphylokokken, Streptokokken und E.coli sowie die hämolytischen Corynebakterien eindeutig von den C. pyogenes-Stämmen zu unterscheiden. Während die C. pyogenes-Antigene Titer von 1 : 50 und darüber erreichten, waren die Antigene der anderen Keime negativ oder reagierten lediglich in der ersten Titerstufe schwach positiv. Die Unterscheidung der präcipitinogenen Wirksamkeit verschiedener C. pyogenes-Stämme war wesentlich kritischer. Sie erfordert die Verbesserung der Aussagekraft eines quantitativen Präcipitationstiters.

Die deutliche und erhebliche Abhängigkeit des Titers vom Substanzgehalt in Form einer Hyperbelfunktion ergibt die Möglichkeit, mit Hilfe

eines recht einfachen, rein rechnerischen Verfahrens den Substanzgehalt zu berücksichtigen. Die Anwendung dieses Verfahrens setzt voraus, daß die verglichenen Titerwerte unter Beachtung der besprochenen methodischen Faktoren hergestellt und gleichartig zur Präcipitation angesetzt wurden, denn die Vergleichbarkeit der Werte wird durch variable Faktoren wesentlich begrenzt.

Von den vier C. pyogenes-Stämmen wurde das Produkt aus Titer und Substanzgehalt gebildet. Daraus ergibt sich für diese Stämme folgender oben näher erläuterter konstanter Faktor a.

Stamm	Faktor a	Abweichung in Prozent vom Mittelwert
J 7	0,0065	−37
Pyo 55	0,0135	+30
56	0,0182	+77
G 11	0,0028	−73
Mittelwert	0,0103	53,4

Aus diesen vier Faktoren wird das arithmetische Mittel gebildet und jeder Einzelwert von a zu diesem Mittelwert, der gleich 100 gesetzt wird, in Beziehung gesetzt. Die sich daraus ergebenden Prozentwerte sind oben hinter den a-Werten angeführt und erlauben nun direkt die Bewertung der einzelnen Stämme. Grundsätzlich weichen bei dieser Berechnungsart die antigenstarken nach der Minusseite und die antigenschwachen nach der positiven Seite hin ab. Das detaillierte Urteil ist vom gewählten Maßstab abhängig. Wir sehen in Abweichungen des a-Wertes von $\pm 50\%$ noch überwiegend methodisch bedingte Streuungen. Erst darüber hinausgehende Werte scheinen uns bewertbar. Damit führt der Vergleich der vier Stämme zu folgendem Ergebnis:

		Titer	g-%
Stamm J 7	normal wirksam	1:200	1,29
Stamm Pyo 55	normal wirksam	1:100	1,35
Stamm 56	schwach wirksam	1: 50	0,91
Stamm G 11	stark wirksam	1:200	0,56

Zum Vergleich sind hinter der Beurteilung die Titer und die Substanzgehalte noch einmal mitaufgeführt. Die Verschiebung der Bewertung zugunsten der Antigene mit geringerem Substanzgehalt ist deutlich zu erkennen. Besonders überraschend ist, daß der C. p.-Stamm 56, obwohl aus einer eitrigen Endometritis isoliert, trotz homologen Serums eine schwache, dagegen der atypische C. pyogenes-Stamm G 11 eine starke Wirksamkeit in der Präcipitation aufwies. Eine Erklärung dafür wird erschwert, weil insbesondere offenbleiben muß, inwieweit der C. pyogenes-Stamm 56 primär oder durch die in Gegensatz zu den anderen Stämmen mehrjährige Passage auf Nährboden sekundär antigenschwach geworden ist. Darüber hinaus kann nicht übersehen werden, ob durch die Verwendung eines Kochantigens bei der Herstellung des Antiserums antigenwirksame Komponenten so verändert werden, daß die feinere Spezifität der Reaktion beeinflußt wird.

Die Stämme J 7 und Pyo 55 sind als normal präcipitinogen wirksam, und zwar der erste als an der oberen und der letzte an der unteren Grenze des Normalbereiches liegend anzusehen.

Selbstverständlich können die Abweichungen auch zu detaillierteren Gruppen aufgegliedert werden und auch der Bereich des Normalwertes eingeengt werden. Jedoch scheint es uns auf Grund unserer Erfahrung nicht ratsam, den Normalbereich enger als $\pm 30\%$ zu wählen.

Zusammenfassung

Die Bedeutung einer Substanzgehaltsbestimmung der gebrauchsfertigen Fuller-Antigene zur Ergänzung einer quantitativen Präcipitation wird herausgestellt. Hierzu wird eine Methode beschrieben, die die Bestimmung des Substanzgehaltes mittels der Ultrazentrifuge ermöglicht.

Auf die Bedeutung verschiedener Herstellungsfaktoren, der Lagerungsfähigkeit und des Gehaltes an unspezifischen Substanzen sowie die Notwendigkeit einer genauen p_H-Einstellung von Fuller-Extrakten für das Präcipitationsergebnis wird eingegangen. Die Beziehungen von Präcipitationsergebnis und Antigenkonzentration werden an Hand einer graphischen Darstellung erläutert.

Die Differenzierungsmöglichkeit von 15 Stämmen aus verschiedenen Bakterienfamilien wird untersucht. Zur Beurteilung der präcipitinogenen Wirksamkeit von mehreren Stämmen der Species C. pyogenes wird ein rechnerisches Verfahren zur Kombination von Titer und Substanzkonzentration angegeben.

Für die Durchführung der technischen Arbeiten sind wir den medizinisch-technischen Assistentinnen Fräulein A. Moritz und B. Osterroth zu besonderem Dank verpflichtet.

Literatur

Frank, H., u. P. H. Koecher: Der Serumeiweißspiegel beim Menschen nach Untersuchungen mit der Biuret-Methode. Dtsch. Arch. klin. Med. **197**, 181—190 (1950).

Hartwigk, H., u. S. Grund: Atypische Corynebakterien beim Rind. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **179**, 499—508 (1960).

Heidelberger, M.: Lectures in Immunochemistry. New York: Academic Press 1956.

Hilliger, H. G.: Eine Rechenhilfe zur quantitativen Auswertung von Serum-Ultrazentrifugendiagrammen nach Philpot-Svensson. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **175**, 258—268 (1959).

Höfle, K. H.: Über eine rechnerische Auswertungsmethode der Papierelektrophorese-Diagramme. Ärztl. Lab. **4**, 304—309 (1958).

Meyerhoff, G.: Über eine Unterschichtungszelle für die Bestimmung niedriger Molekulargewichte in der Geschwindigkeitsultrazentrifuge. Makromolekulare Chem. **15**, 68—72 (1955).

Weichselbaum, T. E.: Accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum in plasma. Amer. J. clin. Path. (Techn. Sec.) **10**, 40—49 (1946).

Dr. Siegfried Grund und Dr. Hans-Georg Hilliger,
Institut für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin,
1 Berlin-Dahlem, Königin Luise Straße 49

Zeitschrift f. Hygiene 148, 582—589 (1962)

Aus der Medizinischen Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. R. Duesberg)

Zur Valenz von präcipitierenden Antigen-Antikörper-Systemen

Von
H. E. Müller und F. Gramlich

(Eingegangen am 31. Juli 1962)

Das Problem der Valenz von Antigen und Antikörper war wiederholt Gegenstand experimenteller Untersuchungen und theoretischer Betrachtungen.

Die experimentelle Bestimmung der Wertigkeit präcipitierender Antikörper erfolgte durch Messungen an löslichen Antigen-Antikörper-Komplexen im Bereich großen Antigen-Überschusses[1,14–16,18,23]. Dabei wurden Antigen-Antikörper-Verhältnisse von 1,5 bis 3 ermittelt, woraus man schloß, daß Antikörper eine Wertigkeit von 1,5 bis 3, meistens 2 besitzen.

Die experimentelle Bestimmung der Valenz präcipitierender Antigene erfolgte bisher meist aus der Analyse der in ein Proteinmolekül synthetisch eingeführten Hapten-Gruppen. Im übrigen blieb die Zahl der in einem nativen Protein vorhandenen Valenzen unbekannt.

Die ersten theoretischen Erörterungen der Valenz, die Pauling[17] anstellte, gingen von der Annahme zweiwertiger Antikörper aus, wie in den oben zitierten Arbeiten gefunden wurde. Auch Goldberg[5–7], der sehr weitgehende, theoretische Betrachtungen an Antigen-Antikörper-Reaktionen anstellte, die sich auf Theorien von Polymerisationsreaktionen von Flory[4] und Stockmayer[24] stützten, ging in seinen ersten Ansätzen[5] noch von dieser Voraussetzung aus und konnte damit unter anderem die Heidelberger-Kendall-Gleichung[11] interpretieren. In weitergehenden Arbeiten betrachtete er dann später[6,7] auch sogenannte g-wertige Antikörper und f-wertige Antigene. Ganz allgemein müssen bei dieser Diskussion die Antigen-, bzw. die Antikörper-Valenzen als unter sich gleichwertige Größen behandelt werden. Für die Antikörper-Valenzen mag das in gewissem Maß zutreffen, für die Antigen-Valenzen wahrscheinlich aber nur noch bedingt; dies geht aus den Versuchen von Haurowitz[8] über die Heterogenität der Antigen-Antikörper-Systeme hervor.

Bisher wurde die Art der Valenzbindung von Pauling[17] weitgehend als Koordinationszahl behandelt, die sich aus Größe und Raumerfüllung von Antigen einerseits und Antikörper andrerseits ergibt.

Im andern Extremfall wird die Valenzbindung zwischen Antigen und Antikörper im Sinn einer chemischen Bindung interpretiert, wobei die Natur dieser Bindung bisher unbekannt geblieben ist.

Im folgenden sei über eine Präcipitationsreaktion von Kaninchen-Antikörper mit Human-Serumalbumin als Antigen berichtet, deren Ergebnisse quantitativ ausgewertet werden. Eine neu entwickelte Theorie, die aus zwei Extremwerten der Präcipitationskurve gleichzeitig die Valenzen von Antigen und Antikörper zu berechnen gestattet, wird auf die experimentell erhaltenen Ergebnisse und ebenso auf ältere Resultate[9] angewandt.

Methode und Material

In den meisten Arbeiten der vergangenen Zeit stützten sich die Aussagen über das Antigen-Antikörper-Verhältnis von Präcipitaten im wesentlichen auf Differenzbestimmungen zwischen dem Gesamtproteingehalt des Präcipitats und dem auf verschiedene Weise gekennzeichneten und definierten Antigen, das zu einer konstanten und bekannten Menge Antikörper zugegeben worden war.

In der vorliegenden Arbeit fertigten wir nach dem Heidelberger-Schema[10,12] eine Präcipitationsreihe an; wir gingen dabei wie folgt vor (Tab. 1):

Zu konstanten Mengen eines mit ^{131}Jod markierten Kaninchen-γ-Globulins mit Antikörpern gegen Human-Albumin (Tab. 1, Spalte 2) wurden steigende Mengen Human-Albumin zugegeben, das mit 2,4-Dinitrofluorbenzol zu dem entsprechenden 2,4-Dinitrophenyl-Albumin (DNP-Albumin) umgesetzt worden war (Tab. 1, Spalte 3) und so durch seine intensiv gelbe Farbe leicht die Anfertigung einer Eichkurve nach photometrischer Bestimmung ermöglichte. Die nach 24stündigem Stehen bei 4° C erhaltenen Präcipitate wurden nach Dekantieren des Überstandes konventionell mit der gleichen Menge physiologischer NaCl-Lösung abgespült und danach in 1 n NaOH aufgelöst. Davon wurde a) eine N-Bestimmung nach Kjeldahl (Tab. 1, Spalte 4), b) eine photometrische Bestimmung des DNP-Albumin-Gehaltes (Tab. 1, Spalte 5), c) eine Aktivitätsmessung des mit ^{131}Jod-markierten γ-Globulins (Tab. 1, Spalte 6) ausgeführt. Außerdem wurden in einem Parallelansatz die sich nach 15 min nach Zugabe steigender Antigen-Mengen zu konstanten Antikörper-Volumina ergebenden Trübungen nephelometrisch[2,12,13,19,21,22] (Tab. 1, Spalte 7) vermessen.

Kaninchen-Antikörper. Kaninchen wurden innerhalb von 28 Tagen durch vier Injektionen von je 4 ml einer Emulsion von 1,6 ml einer 2%igen Human-Albumin-Lösung (Behringwerke, Marburg) in 2,6 ml kompletten Freundschen Adjuvans (Hyland Laboratories, Los Angeles, Calif., USA) in die rasierte Rückenhaut immunisiert. 8 Tage nach der letzten Injektion wurde das Blut durch Herzpunktion (in Barbiturat-Narkose) entnommen. Aus dem daraus gewonnenen Serum wurde mit Ammonsulfat grob die γ-Globulin-Fraktion abgetrennt. Die Jodierung mit ^{131}Jod (Radiochemical Centre, Amersham, England) erfolgte anschließend nach einer leicht modifizierten Methode von Pressman u. Sternberger[20].

DNP-Albumin. Human-Albumin (Behring-Werke, Marburg) wurde in einer wäßrigen $NaHCO_3$-Lösung (0,2 m), die mit 2,4-Dinitrofluorbenzol gesättigt war und überschüssiges Reagens im Bodensatz enthielt, aufgelöst und 2 Std bei Raumtemperatur reagieren lassen. Danach wurde die Lösung vom ungelösten 2,4-Dinitrofluorbenzol durch Dekantieren getrennt und die Lösung einer Dialyse gegen

physiologische NaCl-Lösung unterworfen, wodurch das restliche, gelöste 2.4-Dinitrofluorbenzol entfernt wurde.

Tabelle 1. *Präcipitationsansätze von ^{131}J-Kaninchen-Antikörpern mit DNP-Albumin*

1	2	3	4	5	6	7
Lfd. Nr.	Kaninchen-Antikörper	DNP-Albumin (Antigen)	Präcipitat			
	Konstantes Antikörper-Angebot: $7{,}36 \cdot 10^6$ Imp./min (ml)	Steigende Mengen Antigen in 0,5 ml Volumen (mg)	Gesamteiweiß (Kjeldahl) (mg)	DNP-Albumin, photometrische Bestimmung nach Lösen in NaOH (mg)	Kaninchen-Antikörper Aktivitätsmessung des ^{131}J-Antikörpers (Imp./min)	Nephelometr. Bestimmung des Präcipitats Extinktion bei 578 mμ (Skalenteile)
1	2,5	1,25	(0,007)	0,02	69127	—
2	2,5	2,5	0,28	0,028	110995	160
3	2,5	5,0	0,49	0,056	192879	208
4	2,5	10,1	0,9275	0,069	324610	398
5	2,5	20,2	2,06	0,175	549482	468
6	2,5	40,3	3,29	0,350	894894	548
7	2,5	80,6	4,165	0,520	1064007	—
8	2,5	120,9	4,375	0,530	1102891	592
9	2,5	161,3	5,04	0,730	1216662	—
10	2,5	241,9	4,8825	0,744	1187466	400
11	2,5	322,6	3,85	0,670	896195	138
12	2,5	645,3	1,228	0,228	222155	88

Ergebnis

In Tab. 2 finden sich die aus den Meßergebnissen der Tab. 1 abgeleiteten Resultate.

Tabelle 2. *Antikörper-Antigen-Verhältnisse im Präcipitat*

1	2	3	4	5	6	7
Lfde. Nr.	Gesamtprotein im Präcipitat (mg)	DNP-Albumin im Präcipitat (mg)	Antikörper im Präcipitat (mg)	korr. Ak. im Präcipitat (mg)	Ak./Ag. = 170000 : 70000	Ak./Ag. = 137000 : 68000
1	(0,007)	0,02	—	0,239	4,92	5,93
2	0,28	0,028	0,252	0,384	5,51	6,80
3	0,49	0,056	0,434	0,667	4,90	5,91
4	0,928	0,069	0,859	1,122	6,70	8,07
5	2,06	0,175	1,885	1,900	4,47	5,39
6	3,29	0,350	2,940	3,094	3,64	4,39
7	4,17	0,520	3,645	3,678	2,91	3,51
8	4,38	0,530	3,845	3,813	2,96	3,57
9	5,04	0,730	4,310	4,207	2,37	2,86
10	4,88	0,744	4,137	4,103	2,27	2,74
11	3,85	0,670	3,180	3,098	1,90	2,30
12	1,23	0,228	1,004	0,768	1,39	1,67

Die im Präcipitat vorhandene Antikörpermenge errechnet sich als Differenz aus dem Gesamt-Protein (Tab. 1, Spalte 4 und Tab. 2, Spalte 2) und der photometrisch gemessenen Antigen-Menge (Tab. 1, Spalte 5 und Tab. 2, Spalte 3), was aus Tab. 2, Spalte 4, hervorgeht. Die so gefundene Antikörpermenge entspricht sehr gut den mittleren Werten der Aktivitätsmessungen (Tab. 1, Spalte 6). Mit einem Mittelwert aus diesen Messungen (Nr. 5—11) wurden die gefundenen Werte (Tab. 2, Spalte 4) korrigiert, woraus sich die Werte der Tab. 2, Spalte 5, ergeben, die sich von den Werten der Tab. 2, Spalte 4, hauptsächlich bei den Anfangs- und Endgliedern etwas unterscheiden.

Das molekulare Antikörper-Antigen-Verhältnis errechnet sich als Quotient der so korrigierten Antikörper- und Antigenmengen und ihrer Molekulargewichte. Dazu wurde in Tab. 2, Spalte 6, ein Globulin: Albumin-Verhältnis von 170000:70000 angenommen. Die Werte der Tab. 2, Spalte 7, entsprechen einem Globulin:Albumin-Verhältnis von 137000: 68000, was den neuen Untersuchungen von CAMMACK[3] über das Molgewicht von Kaninchen-γ-Globulin-Antikörpern entspricht.

Theoretische Ableitung

Für die folgende Diskussion der Wertigkeit von Antigenen und Antikörpern soll teilweise die bereits von GOLDBERG[5] angewandte Terminologie benutzt werden:

A = Zahl der Antikörper-Moleküle im System
G = Zahl der Antigen-Moleküle im System
i = Zahl der Antikörper-Moleküle im Präcipitat
k = Zahl der Antigen-Moleküle im Präcipitat
g = Valenz des Antikörpers
f = Valenz des Antigens
$(i/k)_{max}$ = Antikörper-Antigen-Verhältnis mit maximalem Antikörpergehalt des Präcipitats, wenn $A \gg G$
$(i/k)_{äqu}$ = Antikörper-Antigen-Verhältnis im Äquivalenzpunkt, der durch eine maximale Präcipitatmenge charakterisiert sein soll, wenn $A = G$
$(i/k)_{min}$ = Antikörper-Antigen-Verhältnis mit einem minimalen Antikörpergehalt des Präcipitats, wenn $A \ll G$.

In der Präcipitationskurve nach HEIDELBERGER[10,12] lassen sich die drei Extremwerte $(i/k_{max}$, $(i/k)_{äqu}$ und $(i/k)_{min}$ gut erkennen und festlegen. Aus zwei von diesen drei Antikörper-Antigen-Verhältnissen lassen sich jeweils die Valenzen von präcipitierenden Antikörpern und Antigenen errechnen. Die Valenz sei nach der bekannten, schon von PAULING[1] benutzten Grundgleichung (1a), bzw. (1b) definiert:

$$i/k = f/g \qquad (1a)$$

bzw.

$$g \cdot i = f \cdot k \,. \tag{1b}$$

Dabei soll über die Art der Valenz keine Aussage gemacht werden. Unter sich müssen die Valenzen von Antikörpern und Antigenen als gleichwertige Größen betrachtet werden.

Es läßt sich für $A \gg G$ erwarten, daß die Zahl der von einem Antigen-Molekül gebundenen Antikörper-Moleküle maximal die Wertigkeit des Antigen-Moleküls erreichen kann. In diesem Fall wird also von jedem Antikörper-Molekül nur eine Valenz beansprucht, es kann im Präcipitat als effektiv einwertig ($g = 1$) betrachtet werden und aus Beziehung (1a) wird:

$$(i/k)_{\max} = f \,. \tag{2a}$$

Zum Vergleich errechnet sich die Valenz f des Antigens nach Goldberg[5], der von einem etwas anderen Ansatz ausgeht, nach Beziehung (2b) bzw. (2c):

$$(i/k)_{\max} = f - 1 \text{ für } k \gg 1 \tag{2b}$$

bzw.

$$(i/k)_{\max} = f \qquad \text{für } k = 1 \,. \tag{2c}$$

Für $A \ll G$ gilt das Umgekehrte. Hier kann die Zahl der von einem Antikörper-Molekül gebundenen Antigen-Moleküle maximal die Wertigkeit des Antikörper-Moleküls erreichen und in diesem Fall ist jedes Antigen-Molekül effektiv einwertig ($f = 1$). Aus Beziehung (1a) wird:

$$(i/k)_{\min} = 1/g \,. \tag{3a}$$

Streng gilt Beziehung (3a) nur für die löslichen Komplexe. Für das im Bereich $A \ll G$ ausfallende Präcipitat gilt besser die Ungleichung (3b):

$$(i/k)_{\min} > 1/g \,. \tag{3b}$$

Daß im Bereich eines Antigen-Überschusses überhaupt noch Präcipitate auftreten, ist weitgehend durch die technische Ausführung der Präcipitationsreaktion bedingt, weil das Antigen zu einer gegebenen Antikörper-Menge in steigenden Konzentrationen zugegeben wird. Dabei entstehen trotz Antigen-Überschusses stets lokale Bereiche mit Antikörper-Überschuß, die dann zur Präcipitation Anlaß geben.

Allgemein ist die Löslichkeit der Antigen-Antikörper-Komplexe im Bereich des Antigen-Überschusses und die Unlöslichkeit von Antigen-Antikörper-Komplexen im Bereich des Antikörper-Überschusses bedingt durch das Verhältnis $f > g$, bzw. $f > 2$. Für $f = g = 2$ wären prinzipiell gar keine Präcipitate zu erwarten. Umgekehrt wären für $f = g \geqslant 3$ nur Präcipitate und keine löslichen Komplexe zu erwarten. Ähnliches zeigt Pauling[17].

Für den Äquivalenzpunkt der Präcipitationsreihe, wo $A = G$, gilt unter Berücksichtigung von (2a) und (3a):

$$(i/k)_{\text{äqu}} = f/g \,. \tag{4}$$

Aus den Beziehungen (2a) und (4), falls lösliche Komplexe und deren Molverhältnis bekannt ist auch aus (3a) lassen sich sowohl die Antigen-, wie die Antikörper-Valenzen berechnen.

Diskussion

In Tab. 3 wurden die oben abgeleiteten Beziehungen (2a), (3a), (3b) und (4) auf Antikörper-Antigen-Verhältnisse, die HEIDELBERGER[9]

Tabelle 3. *Die Berechnung der Antigen- und Antikörper-Valenzen nach Bez. (2a), (3a), (3b) und (4)*

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Antigen	$(i/k)_{\max}$	f nach (2a)	$(i/k)_{\text{äqu}}$	g nach (4)	$(i/k)_{\min}$	g nach (3b)	Lösl. Kompl.	g nach (3a)
Krist. Ei-Albumin	5	5	3 — 2,5	1,7—2	2	> 0,5	(1)	(1)
Gefärbt. Ei-Albumin	5	5	3 — 2,5	1,7—2	0,75	> 1,33	(0,5)	(2)
Serum-Albumin	6	6	4 — 3	1,5—2	2	> 0,5	(1)	(1)
Thyro-Globulin	40	40	14 —10	2,9—4	2	> 0,5	(1)	(1)
Typ III Pneumo-coccus	1	1	0,67— 0,5	1,5—2	0,25	> 4	(0,2)	(5)
DNP-Albumin (s. Tab. 2)	6	6	3,5 — 2,5	1,7—2,4	1,5	> 0,7	—	—

zusammengestellt hat, und ebenso auf die eigenen, aus Tab. 2 stammenden Werte angewandt. Für diese verschiedenen Systeme wurden die Antigen-Valenzen (f) und die Antikörper-Valenzen (g) errechnet.

Wie man sieht (Tab. 3), entsprechen die g-Werte recht gut den Resultaten aus anderen Untersuchungen; die Antikörper scheinen zweiwertig zu sein. Die Valenz der Antigene ist, worauf PAULING[17] auf Grund seiner Überlegungen über die Koordinationsfähigkeit hinwies, von der Größe des Moleküls abhängig. Im übrigen stimmen die aus verschiedenen Untersuchungen stammenden Ergebnisse sehr gut überein. Bei den Valenzberechnungen aus den $(i/k)_{\min}$-Präcipitaten und aus den löslichen Komplexen ergeben sich weniger gut übereinstimmende Resultate, doch war diese Tatsache schon aus den theoretischen Erörterungen abzuleiten.

Zusammenfassung

Es werden einige Beziehungen abgeleitet, die gleichzeitig die Berechnung der Antigen- und der Antikörper-Valenzen aus zwei verschiedenen Antigen-Antikörper-Verhältnissen eines Präcipitats gestatten. Die Beziehungen werden auf schon vorliegende Untersuchungsergebnisse angewandt und ebenso auf ein Antigen-Antikörpersystem, dessen zahlenmäßiges Verhältnis nach einer verfeinerten Methodik erhalten worden war.

Die Antikörper-Valenzen liegen zwischen 1,5 und 4, meist bei 2. Die Valenzen der Antigene sind abhängig vom Molekulargewicht; sie liegen für die untersuchten Proteine zwischen 5 und 40.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, durch deren Mittel diese Untersuchungen ermöglicht wurden, möchten wir an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Literatur

[1] Baker, M. C., D. H. Campbell and S. I. Epstein: Physical chemical studies of soluble antigen-antibody complexes. VII. Thermodynamics of the reaction between benzenearsonic acid-azo-bovine serum albumin and rabbit antibodies to benzenearsonic acid. J. Amer. chem. Soc. **78**, 312 (1956).

[2] Boyden, A., E. Bolton and D. Gemeroy: Precipitin testing with special reference to the photoelectric measurement of turbidity. J. Immunol. **57**, 211 (1947).

[3] Cammack, K. A.: Molecular weight of rabbit gamma globulin. Nature (Lond.) **194**, 745 (1962).

[4] Flory, P. J.: Molecular size distribution in linear condensation polymers. J. Amer. chem. Soc. **58**, 1877 (1936). — Molecular size distribution in three dimensional polymers. I Gelation. J. Amer. chem. Soc. **63**, 3083 (1941). — Molecular size distribution in three dimensional polymers. II. Trifunctional branching units. J. Amer. chem. Soc. **63**, 3091 (1941). — Molecular size distribution in three dimensional polymers. III. Tetrafunctional branching units. J. Amer. chem. Soc. **63**, 3096 (1954). — Molecular size distribution in three dimensional polymers. VI., Branched polymers containing A—R—B_{f-1} type units. J. Amer. chem. Soc. **74**, 2718 (1952).

[5] Goldberg, J. R.: A theory of antibody-antigen reactions. I. Theory for reaction of multivalent antigen with bivalent and univalent antibody. J. Amer. chem. Soc. **74**, 5715 (1952).

[6] Goldberg, J. R.: A theory of antibody-antigen reactions. II. Theory for reactions of multivalent antigen with multivalent antibody. J. Amer. chem. Soc. **75**, 3127 (1953).

[7] Goldberg, J. R., and J. W. Williams: Antigen-antibody reaction in theory and practice. Faraday Soc. Disc. **13**, 224 (1953).

[8] Haurowitz, F.: Separation and determination of multiple antibodies. J. Immunol. **43**, 331 (1942).

[9] Heidelberger, M.: The molecular composition of specific immune precipitates from rabbit sera. J. Amer. chem. Soc. **60**, 242 (1938).

[10] Heidelberger, M., and F. E. Kendall: Quantitative studies on the precipitin reaction. — The determination of small amounts of a specific polysaccharide. J. exp. Med. **55**, 555 (1932).

[11] Heidelberger, M., and F. E. Kendall: The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. — III. A quantitative study and a theory of the reaction mechanism. J. exp. Med. **61**, 563 (1935).

[12] Kabat, E. A., and M. M. Mayer: Experimental Immunochemistry. Springfield, Ill.: C. C. Thomas 1961.

[13] Libby, R. L.: The photronreflectometer. — An instrument for the measurement of turbid systems. J. Immunol. **34**, 71 (1938).

[14] Marrack, J. R., and H. Hoch: The valency of antibodies. Brit. J. exp. Path. **32**, 212 (1951).

[15] Oncley, J. L., and D. Gitlin: Protein-protein interactions. J. Phys. Chem. **56**, 85 (1952).

[16] Pappenheimer, A. M., jr., H. P. Lundgren and J. W. Williams: Studies on the molecular weight of diphtheria toxin, antitoxin and the reaction products. J. exp. Med. **71**, 247 (1940).

[17] Pauling, L.: A theory of the structur and process of formation of antibodies. J. Amer. chem. Soc. **62**, 2643 (1940).

[18] Plescia, O. J., E. L. Becker and J. W. Williams: The valence of precipitating antibodies. J. Amer. chem. Soc. **74**, 1362 (1952).

[19] Pope, C. G., and M. Healey: Brit. J. exp. Path. **19**, 397 (1938).

[20] Pressman, D., and L. A. Sternberger: The relative rates of iodination of serum components and the effect of iodination on antibody activity. J. Amer. chem. Soc. **72**, 2226 (1950).

[21] Schultze, H. E., u. G. Schwick: Quantitative immunologische Bestimmung der Plasmaproteine. Behringwerk-Mitteilungen **35**, 1 (1958).

[22] Schultze, H. E., u. G. Schwick: VI. Colloquium Sint Jans Hospital, Brügge 1958; zit. nach [21].

[23] Singer, S. J., and D. H. Campbell: The valence of precipitating rabbit antibody. J. Amer. chem. Soc. **73**, 3543 (1951).

[24] Stockmayer, W. H.: Molecular distribution in condensation polymers. J. chem. Phys. **11**, 45 (1943). — J. Polymer. Sci. **9**, 69 (1952).

Dr. F. Gramlich, Medizinische Poliklinik der Universität, 65 Mainz, Langenbeckstr. 1

Zeitschrift f. Hygiene 148, 590–595 (1962)

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität
des Saarlandes in Homburg-Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. W. Zimmermann)

Katalaseaktivität und Resistenz von S. typhimurium gegenüber Spiramycin

Von
Ursula Mayer

(Eingegangen am 4. August 1962)

T. S. und E. Work äußerten die Vermutung, daß Wachstumshemmungen bei Mikroorganismen durch Chemotherapeutica wahrscheinlich auf Blockierungen von enzymatischen Reaktionen zurückzuführen seien. Diesem Gedankengang folgend wurde der Zusammenhang von Fermentaktivität und Antibiotica-Resistenz schon oft untersucht. In eigenen Untersuchungen wurde die Antibiotica- bzw. Sulfonamid-Resistenz von elf Stämmen von Salmonella typhimurium, deren Virulenz und Katalaseaktivität genau bekannt war, getestet. Untersucht wurden Spiramycin, Penicillin, Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und ein Sulfonamid; das interessanteste Ergebnis zeigte sich beim Spiramycin-Test.

Uecker (1954) untersuchte die Einwirkung von *Dehydrostreptomycin*, *Paraaminosalicylsäure* und *Sulfathiazol* auf die Katalaseaktivität des Mycobakterienstammes 3 H ohne positives Ergebnis. Takushina (1957) fand, daß durch Einwirkung von *Cycloserin* die Dehydrierung von Malonsäure und die Katalaseaktivität bei Tuberkelbakterien gehemmt werden, am deutlichsten bei einem p_H von 7,2–7,4. Glodny (1960) konnte bei Staphylokokken keine deutliche Abhängigkeit der *Penicillin*empfindlichkeit von der Stoffwechselaktivität feststellen.

Die Einwirkung von *Isonicotinsäurehydrazid* (INH) auf die Katalaseaktivität von Mycobacterium tuberculosis ist von sehr vielen Forschern untersucht worden. Bönicke (1954, 1956), Uecker (1955) und Kreis (1957) berichten über die katalasehemmende Wirkung des INH. Bönicke verweist auf grundlegende Arbeiten von Aronson, Ehrlich u. Flag (1952), von Gray (1953) und von Middlebrook (1954) und untersuchte die Einwirkung verschiedener Säurehydrazide auf die Katalase von 14 verschiedenen Mycobakterienstämmen, einem Stamm von Escherichia coli und einem von Micrococcus pyogenes var. aureus. Er stellte fest, daß INH, Nicotinsäurehydrazid und Benzoesäurehydrazid die Katalase namentlich der Mycobakterien hemmen und daß von diesen dreien INH die kleinste antikatalatische, aber die stärkste tuberkulostatische Wirksamkeit hat. Uecker (1954 und 1955) maß an einem apathogenen Mycobakterienstamm die Katalaseaktivität in Gegenwart von Streptomycin, PAS, Sulfathiazol und Isoniacid und stellte bei letzterem eine hemmende Wirkung fest. Er berichtet, daß die Katalasehemmung durch INH in zellfreien Enzymlösungen höher als in einer Zellsuspension war und daß ebenfalls die Katalase von Escherichia coli und eine von Uecker selbst hergestellte kristalline

Mäuseleberkatalase genauso durch INH gehemmt werden. Hier muß auch die Entdeckung von Middlebrook (1954) erwähnt werden, daß den Tuberkelbakterien bei Erwerb der INH-Resistenz die Katalaseaktivität verlorengeht, welche von Bönicke (1954); Conalty u. Gaffney (1955); Gernez-Rieux, Tacquet, Voisin u. Fabre (1955); Meissner (1955); Patnode (1955); Desbordes, Fournier, Rosenberg u. Alix (1956); v. Liew (1957); Desbordes, Fournier u. Alix (1956); Andrejew, Tacquet u. Gernez-Rieux (1956) bestätigt wurde. Letztgenannte sechs Autoren betonen, daß INH-Resistenz und Katalaseverlust einander nicht genau parallel gehen. Allerdings sollen nach Uecker (1955) an Isoniacid adaptierte saprophytäre und aviäre Mycobakterien eine gegenüber hohen Konzentrationen von INH resistente Katalase besitzen.

Kreis (1958) untersuchte die Art der Wirkung von INH auf die Katalase von Mycobakterien und nennt verschiedene Substanzen, welche die INH-Wirkung favorisieren, hemmen oder auch indifferent lassen. Bönicke (1956) fand eine Verstärkung der INH-Wirkung durch Wasserstoffsuperoxyd und eine Verminderung der INH-Wirkung durch Zusatz von Hämin (katalatisch wirksamer Stoff) oder Kobaltphthalocyanin oder Mangan-II-Chlorid [vgl. Kreis (1958)]. Nach Uecker (1954) wird durch INH wie auch durch *Dihydromycin* insgesamt die Atmung wachsender Mycobakterien gehemmt. Ähnliche Beobachtungen werden von Grumbach (1950) beschrieben, der einen 1944 von Mc Leod und seinen Mitarbeitern aufgestellten Versuch zitiert, bei dem *Sulfonamid*-empfindliche, aerob und fakultativ anaerob wachsende Keime in Schüttelagarkulturen bei Sauerstoffzutritt durch Sulfonamidkonzentrationen, welche das anaerobe Wachstum vollständig unbeeinflußt ließen, gehemmt werden. Hier könnte es sich möglicherweise um eine Katalasehemmung durch Sulfonamid handeln. Wichtige Beobachtungen hierzu stammen von Lang (1954): *Penicillin* und andere Antibiotica wie auch verschiedene Sulfonamide können unter gewissen Bedingungen die Aerobiose von Bakterien hemmen, welche anaerob unbeeinflußt bleiben. Bingold u. Lang (1955) zitieren folgende Beobachtung von Grumbach: Staphylokokken oder Streptokokken, die zur fakultativen Anaerobiose fähig sind, lassen sich durch Einwirkung von Antibiotica und auch Chemotherapeutica zur obligaten Anaerobiose zwingen. *Penicillin, Streptomycin* und *Sulfonamide* erlauben in unterschwelligen Dosen in anaeroben Zonen eines Nährmediums noch ein Wachstum. Lang (1954) zitiert Braun (München), der ähnliche Erscheinungen bei Bakterien beobachtet hat, zu deren Kulturen *Lithium* oder *Caesium* in bestimmter Konzentration zugesetzt war. Lang kommt zu folgendem Schluß: „Da sich Bakterienherde häufig unter anaeroben Verhältnissen befinden, ist es möglich, daß hierin ein weiteres Hindernis für die Wirksamkeit des antibiotischen Mittels liegt." Alle diese Beobachtungen der Hemmung der aeroben Atmung durch INH wie auch durch Dihydromycin, Sulfonamid, Penicillin, Streptomycin, Lithium oder Caesium erlauben die Hypothese, daß durch diese Substanzen die Katalaseaktivität gehemmt wird.

Nach Krüger-Thiemer (1955, 1958) endlich besteht der tuberkulostatische Effekt des INH nicht in seiner direkten schädlichen Einwirkung auf das Katalaseenzym, sondern ist viel eher das Resultat einer kompetitiven Hemmung des Coenzym I und des Coenzym II durch INH. Diese beiden Enzyme haben nach Jensen (1957) bei der Synthese der Katalase eine große Bedeutung. So beobachteten Vischer, Tirunarayanan u. Bruhin (1959) im Reagensglas keine Einwirkung des INH auf die Katalase- oder Peroxydase-Aktivität, womit sie den Befunden von Uecker (1954 und 1955) widersprechen. Vischer, Tirunarayanan u. Bruhin beschreiben, daß die erste auftretende Änderung der Bakterien bei Erwerb der INH-Resistenz der Verlust der Peroxydaseaktivität ist; und da ihnen in diesem Falle keine Ausnahme bekannt geworden ist, geben sie den Peroxydasetest als sichere

Untersuchungsmethode der INH-Resistenz an, was von v. BERTRAB (1959) bestätigt wurde. Dieser Befund kann durch die Feststellung von THEORELL (1950) erklärt werden, daß Hydrazine mit Peroxydasen Verbindungen eingehen. LUGOSI (1959) betont, daß zwischen dem Sensibilitätsgrad gegen INH und der Katalaseaktivität keine engen Beziehungen bestehen; auch VIALLIER u. CAYRE (1956) kommen auf Grund ihrer Ergebnisse zu dem Schluß, daß die Messung der Katalaseaktivität der Mycobakterien kein Ersatz für die Resistenzprüfung gegen INH ist.

Die Erforschung des Einflusses von Antibiotica und Chemotherapeutica auf die Katalaseaktivität erfährt noch eine neue Wendung, wenn man zusätzlich die Virulenz der Bakterien berücksichtigt. Denn man beobachtete, daß bei Tuberkelbakterien mit dem Verlust der Katalaseaktivität ein Verlust der Virulenz und ein Gewinn der INH-Resistenz einhergeht. In diesem Zusammenhang sind folgende Arbeiten besonders interessant: MEISSNER (1955); PEIZER u. WIDELOCK (1955); VISCHER, TIRUNARAYANAN u. BRUHIN (1955); WOLINSKY, SMITH u. STEENTZEN jr. (1956); HEILMEYER u. WALTER (1957); EBINA u. TAKASHINA (1957).

Tabelle

Gruppe I. Stämme hoher Virulenz und starker Katalaseaktivität

Antibioticum	Stamm 5999	3707	3620
Spiramycin	1—2	R	R
Sulfonamid	3	3	3
Streptomycin	3	3	3
Chloramphenicol	3	3	3
Tetracyclin	1—2	1—2	1—2
Penicillin	R	R	R

Gruppe II. Stämme mittlerer Virulenz und Katalaseaktivität

Antibioticum	Stamm 3556	3675	S 7	B 1
Spiramycin	R	1—2	1—2	R
Sulfonamid	3	3	1—2	1—2
Streptomycin	3	3	3	3
Chloramphenicol	3	3	3	3
Tetracyclin	1—2	1—2	1—2	1—2
Penicillin	R	R	R	R

Gruppe III. Stämme geringer Virulenz und schwacher Katalaseaktivität

Antibioticum	Stamm B2	B3	S 206 S	S 206 R
Spiramycin	1—2	1—2	1—2	3
Sulfonamid	3	3	1—2	3
Streptomycin	3	1—2	3	3
Chloramphenicol	3	3	3	3
Tetracyclin	1—2	1—2	1—2	1—2
Penicillin	R	R	R	R

Alle zitierten Ergebnisse waren genug Anregung zu den eigenen Versuchen. Elf verschiedene Stämme von Salmonella typhimurium wurden mit dem im Institut üblichen Lochtest auf ihre Resistenz gegen Spiramycin, Sulfonamid, Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und

Penicillin untersucht. Jedes Antibioticum wurde in einer schwachen und einer stärkeren Konzentration geprüft. Die Ergebnisse werden in der Tabelle wiedergegeben; dabei bedeutet R = Resistenz, 1—2 = mäßige und 3 = starke Empfindlichkeit. Die Keime wurden in drei Gruppen zusammengestellt, in eine von Stämmen hoher Virulenz und starker Katalaseaktivität, in eine mittlerer Virulenz und Katalaseaktivität und in eine geringer Virulenz und schwacher Katalaseaktivität.

Gegenüber Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Penicillin verhielten sich alle drei Bakteriengruppen gleichartig: Für Streptomycin und Chloramphenicol waren sie hoch empfindlich, für Tetracyclin mäßig empfindlich und gegenüber Penicillin alle resistent.

Sulfonamid gegenüber waren die stark Katalase-aktiven Stämme ausschließlich sehr empfindlich, die schwächer Katalase-aktiven Stämme waren zum Teil nur mäßig empfindlich. Jedoch ist das Ergebnis nicht ganz eindeutig und erlaubt keine Schlüsse auf eine Abhängigkeit von Sulfonamid-Empfindlichkeit und Katalaseaktivität.

Beim Test mit Spiramycin war das Ergebnis auffälliger: Die Stämme mit starker bis mittlerer Katalaseaktivität zeigten eine Resistenz bis mäßige Empfindlichkeit; von den schwach Katalase-aktiven Stämmen war keiner resistent, sondern alle mäßig empfindlich. Der Katalaseschwächste Stamm der Untersuchungsserie war der Spiramycin-empfindlichste Stamm. Man könnte also einen umgekehrten Befund wie bei Isoniazid erheben, wenn man unterstellt, daß die Katalasewirkung nicht durch das Antibioticum gehemmt wird, sondern ihrerseits das Antibioticum unwirksam macht.

Zusammenfassung

Elf Stämme von Salmonella typhimurium, deren verschiedene Katalaseaktivität und Virulenz bekannt ist, wurden mit dem Lochtest auf ihre Resistenz gegenüber Spiramycin, Sulfonamid, Streptomycin, Tetracyclin und Penicillin untersucht. Dabei fand sich ein umgekehrtes Ergebnis wie bei der Katalaseaktivität, Virulenz und INH-Empfindlichkeit des Mycobacterium tuberculosis: Die Katalase-reichen Stämme waren resistent oder nur mäßig empfindlich gegenüber Spiramycin und die Katalase-armen Stämme alle empfindlich.

Literatur

Andrejew, A., A. Tacquet et Ch. Gernez-Rieux: Activité catalasique des Mycobactéries. Ann. Inst. Pasteur **91**, 767—770 (1956).

Aronson, J. D., S. L. Ehrlich and W. Flag: Effects of isonicotinic acid derivatives of tubercle bacilli. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **80**, 259—262 (1952).

Bertrab, R. v.: Untersuchungen über die Peroxydase- und die Katalaseäktivität frisch isolierter Tuberkelbakterien. Schweiz. med. Wschr. **33**, 868—870 (1959).

Bingold, K., u. W. Lang: Die Bakterienkatalase. Studien über ihr Wesen und ihre Bedeutung. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **163**, 357—368 (1955).

BÖNICKE, R.: Die Katalaseaktivität INH-sensibler und INH-resistenter Mycobakterien und ihre Hemmbarkeit durch INH. Naturwissenschaften **41**, 430 (1954).

BÖNICKE, R.: Die Vermehrung isoniazidresistenter Varianten des Tuberkelbakteriums in Gegenwart von Metallverbindungen des Chlorophyllins. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **142**, 436—444 (1956).

BÖNICKE, R.: Untersuchungen über die antikatalatische Wirkung des Isoniazids bei Mycobakterien. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **142**, 347—362 (1956).

BÖNICKE, R.: Die bakteriotoxische Wirkung des Wasserstoffsuperoxyds in Gegenwart von INH unter besonderer Berücksichtigung INH-sensibler und INH-resistenter Tbc-Stämme. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **142**, 339—346 (1956).

CONALTY, M. L., and E. E. GAFFNEY: Studies on isoniazid-resistent strains of mycobacterium tuberculosis; virulence for mice and guinea pigs and growth pattern (cording) in vitro of strains of resistant to 100 micrograms of isoniazid per milliliter. Amer. Rev. Tuberc. **71**, 599—609 (1955).

DESBORDES, J., E. FOURNIER et D. ALIX: Notes de physiologie bactérienne. Résistance aux antibiotiques et activité enzymatique des bacilles tuberculeux; catalase. Ann. Inst. Pasteur **90**, 783—786 (1956).

DESBORDES, J., E. FOURNIER, E. ROSENBERG et D. ALIX: Contribution à l'étude de la physiologie bactérienne; virulence et équipement enzymatique des mycobactéries. Ann. Inst. Pasteur **91**, 22—30 (1956).

EBINA, and TAKASHINA: Über die Beziehungen zwischen der Isoniazidresistenz, der Katalaseaktivität und der Virulenz der Tuberkelbakterien. Sc. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ., Ser. C **7**, 165—177 (1957).

GERNEZ-RIEUX, C., A. TACQUET, C. VOISIN et M. FABRE: Virulence pour la souris, le cobaye et le hamster des bacilles résistants à l'isoniazide; observations cliniques chez les malades porteurs de bacilles de virulence atténuée. Rev. Tuberc. (Paris) **19**, 1—20 (1955).

GLODNY, H.: Über die Beziehungen zwischen Enterotoxin- und Alphahaemolysinbildungsvermögen, Atmungsaktivität und Penicillinresistenz bei Staphylokokken. Med. Dissertation. Münster 1960.

GRAY, C. T.: Nature of the action of isonicotinic acid hydrazide on the mycobacteria. VI. Congresso Internationale di Microbiologia, 6.—12. Sept. 1953, Riassunti delle Comuniazioni **179**, 269 (1953).

GRUMBACH, A.: Zum Wirkungsmechanismus der Antibiotica. Schweiz. Z. Path. Bakt. **13**, 586—593 (1950).

HEILMEYER, L., u. A. M. WALTER: Resistenz und Virulenz von Tuberkelbakterien in klinischer Sicht. Dtsch. med. Wschr. **82**, 941—942 (1957).

JENSEN, J.: Biosynthesis of hematin compounds in a hemin requiring strain of micrococcus pyogenes var. aureus. I. The significance of coenzyme A for the terminal synthesis of catalase. J. Bact. **73**, 324—333 (1957).

KREIS, B.: Les déficiences enzymatiques des bacilles tuberculeux isoniazido-résistants. Techniques de dosage de la catalase. Advanc. Tuberc. Res. **9**, 178—247 (1958).

KRÜGER-THIEMER, E.: Chemismus der Isoniazidspaltung durch Hämin. Naturwissenschaften **42**, 47 (1955).

LANG, W.: Zur Frage der bakteriziden Wirkung der Antibiotica und die Bedeutung für die therapeutische Anwendung. Medizinische **47**, 1574 (1954).

VAN LIEW, R. H.: Untersuchungen über die Katalaseaktivität von Tuberkelbakterien. Amer. Rev. Tuberc. **70**, 1001—1015 (1957).

LUGOSI, L.: La capacité des mycobactéries saprophytes de tolérer H_2O_2 (indiqué par le changement d'oxydoréduction) et ses rapports avec leur sensibilité catalasique. Ann. Inst. Pasteur **97**, 597—606 (1959).

Meissner, G.: Zur Frage der Virulenz chemoresistenter Tuberkelbakterien. III. Mitteilung. Mischung von sensiblen und INH-resistenten Einzelkolonienkulturen. Beitr. Klin. Tuberk. **113**, 62—74 (1955).

Meissner, G.: Zur Frage der Virulenz chemoresistenter Tuberkelbakterien; die Virulenzschädigung von Sputumstämmen in Abhängigkeit von ihrer Sensibilitätsminderung gegenüber INH. Beitr. Klin. Tuberk. **113**, 280—291 (1955).

Meissner, G.: Die Problematik der Kombinationstherapie bei der Lungentuberkulose; bakteriologische Ergebnisse bei Monotherapie mit INH und Streptomycin. Beitr. Klin. Tuberk. **119**, 371—375 (1958).

Meissner, G.: Der Einfluß des Bacillus auf den Ablauf der Tuberkulose. Acta tuberc. scand. **37**, 5—41 (1959).

McLeod, I. W., and P. Govenlock: The Production of bactericidins by microorganisms. Lancet **100**, 900—903 (1921).

Middlebrook, G.: Isoniazid-resistance and Catalase activity of tubercle bacilli; preliminary report. Amer. Rev. Tuberc. **69**, 471—472 (1954).

Patnode, R. A., M. C. Dail and F. C. Hudgins: Growth characteristics, virulence, and cytochemical properties of tubercle bacilli recovered from patients treated with isoniazid. Amer. J. publ. Hlth **45**, 451—456 (1955).

Peizer, L. R., and D. Widelock: Die Korrelation von Katalaseaktivität, Meerschweinchenvirulenz und Isoniazidresistenz bei Tuberkelbakterien, die aus Patientenmaterial während der Isoniazidbehandlung isoliert wurden. Amer. Rev. Tuberc. **72**, 246—251 (1955).

Pothmann, F. J.: Über die Virulenz Isoniazid-resistenter Tuberkelbakterien. Dtsch. med. Wschr. **1957 I**, 292—294.

Takushina, J.: Untersuchungen über die Wirkungsmechanismen antituberkulöser Substanzen. Sc. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. Ser. C **7**, 303 (1957).

Theorell, H.: Einige neue Untersuchungen über Cytochrome, Peroxydasen und Katalasen. Ergebn. Enzymforsch. **9**, 231 (1943).

Theorell, H.: Heme-linked groups and mode of action of some hemoproteins. Advanc. Enzymol. **7**, 265 (1947).

Theorell, H.: In: Sumner and Myrbäck: The enzymes, chemistry and mechanism of action, II, 1, 335; II, 1, 297. New York: Academic Press 1951.

Uecker, W.: Untersuchungen an Enzymen von Mycobakterien. Phil.-Dissertation. Kiel 1954.

Uecker, W.: Enzyme der Mycobakterienarten. I. Mitteilung: Die Hydroperoxydasen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **164**, 424 (1955). — Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **169**, 251 (1958).

Viallier, J., et R. M. Cayré: Katalaseaktivität und INH-Empfindlichkeit pathogener Mycobakterien. Ann. Inst. Pasteur **90**, 373—374 (1956).

Vischer, W. A., N. O. Tirunarayanan u. H. Bruhin: Neue chemische Methode zur raschen Unterscheidung Isoniazid-sensibler und Isoniazid-resistenter Tuberkelbakterien. Schweiz. Z. Path. Bakt. **22**, 577—588 (1959).

Wolinsky, E., M. M. Smith and W. Steenken jr.: INH-Empfindlichkeit, Katalaseempfindlichkeit und Meerschweinchenvirulenz unlängst isolierter Kulturen von Tuberkelbakterien. Amer. Rev. Tuberc. **73**, 768—772 (1956).

Work, T. S., et E. Work: Bases de la chimiothérapie. Edinburgh-London: Oliver and Boyd 1948.

Dr. Ursula Mayer,
Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität,
665 Homburg/Saar

Zeitschrift f. Hygiene 148, 596–603 (1962)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. R. Haas)

Untersuchungen über die Streptokokken-Diphosphopyridinnucleotidase

IV. Untersuchungen zur Frage der Eignung der Streptokokken-DPNase als Antigen für die Serodiagnose der Streptokokken-Infektionen

Von
K. F. Petersen*

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. August 1962)

Im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Antikörpern gegen die Streptokokken-DPNase** im Serum wurde bereits erwähnt[19], daß durch Untersuchung eines Serums an 28 verschiedenen Tagen eine Streuung der Ergebnisse ermittelt wurde, die durch eine Standardabweichung ($\pm 2\,\sigma$) von $\pm 5{,}6\%$ gekennzeichnet ist: 28 Untersuchungen ergaben einen Mittelwert (arithmetisches Mittel) von 149 $\pm$ 8,65 AntiDPNase E/ml. Unter der bei genauer Einhaltung konstanter Reaktionsbedingungen berechtigten Annahme, daß die erhaltenen Titerwerte normal verteilt sind, bedeutet dies, daß 95% aller Einzelwerte in einem Bereich von $11{,}2\%$ um den Mittelwert streuen. Daraus ergibt sich eine gegenüber anderen Reaktionen zum Nachweis von Antikörpern gegen Stoffwechselprodukte der Streptokokken ausgezeichnete Reproduzierbarkeit. Von verschiedenen Autoren werden (nach Christ[5]) folgende methodisch bedingte Streubereiche angegeben:

Für die Antistreptolysin-Reaktion: $\pm 20\%$ (Kalbak[11]), $\pm 30\%$ (Legler[15], Köhler[13]);

für die Antihyaluronidase-Reaktion:

a) „mucin clot prevention test“: $\pm 25\%$ (McClean[16]); $\pm 60\%$ (Friou u. Wenner[8], Friou[7]); $\pm$ 1 Titerstufe (Faktor 2) (Quinn[20]);

b) Trübungsreduktions-Test: $\pm 20\%$ (Harris u. Harris[9]); $\pm 15\%$ (Faber[6]);

für die Antistreptokinase-Reaktion:

$\pm 30\%$ (Kaplan[12]).

Lediglich von Bernhard u. Stollerman[2] sind wesentlich günstigere Werte angegeben worden:

Antistreptolysin $\pm 5\%$; Antihyaluronidase $\pm 14{,}2\%$; Antistreptokinase $\pm 5\%$; AntiDPNase $\pm 7{,}3\%$.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Die angewandten Abkürzungen entsprechen denen der 1. Mitteilung.

Diese Angaben sind jedoch mit den vorher zitierten nicht ohne weiteres vergleichbar, da im Gegensatz zu diesen ihrer Berechnung der geometrische Mittelwert und damit die Differenzen der Logarithmen der Einzelwerte von dem des geometrischen Mittelwertes zugrunde liegen.

Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen wurden zur Beantwortung der Frage, ob die in Patientenseren nachweisbare DPNase-Hemmung durch Immunantikörper verursacht sei, in den durch die elektrophoretische Trennung erhaltenen Fraktionen eines „positiven" Serums die Antistreptolysin- und die AntiDPNase-Aktivität sowie der Gehalt an γ-Globulin bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde ein Serum mit hohem Antistreptolysin- und AntiDPNase-Titer (960 ASE/ml, 1900 AntiDPNase-E/ml) in einer Apparatur zur kontinuierlichen Papierelektrophorese (Spinco Modell CP der Firma Beckman Instrumentals) bei +4° C und einer konstanten Stromstärke von 25 Milliamp. (das entspricht einer Spannung von 575 V) getrennt. Als Pufferlösung diente ein 0,02 molarer Veronal/Veronal-Natrium-Puffer von p_H 8,4*.

In den auf diese Weise erhaltenen elektrophoretischen Fraktionen wurden bestimmt:

a) AntiDPNase-Gehalt nach der in der 2. Mitteilung[19] beschriebenen Methode.

b) Antistreptolysin-Gehalt nach der von Schultze u. Mitarb.[23] beschriebenen Methode (geringfügig modifiziert).

c) γ-Globulin-Gehalt in Milligrammprozent (halbquantitative Methode im Ouchterlony-Test).

Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, besteht eine eindeutige Abhängigkeit zwischen dem γ-Globulin-Gehalt der Fraktionen und ihrem Anti-DPNase- bzw. Antistreptolysin-Titer, so daß aus diesem Versuch wohl geschlossen werden darf, daß beide Aktivitäten in der γ-Globulin-Fraktion des Serums lokalisiert und damit als Immunantikörper anzusehen sind.

Es wurde ferner die Fraktion 18, welche den höchsten Gehalt an Streptokokken-Antikörpern aufwies, unter Verwendung der von Scheidegger[21] angegebenen Mikromethode immunelektrophoretisch untersucht. Als Kontrolle diente ein normales Menschenserum. Für die Darstellung der Serumfraktionen wurde ein Antihumanglobulinserum vom Pferd (Institut Pasteur, Paris) angewandt**. Mit dieser Methode konnte in der Fraktion 18 nur eine mit dem Antihumanglobulinserum reagierende Komponente nachgewiesen werden, bei der es sich, wie der

* Die elektrophoretische Fraktionierung des Serums erfolgte in der Abteilung für experimentelle Therapie, wofür ich Herrn Prof. Dr. Marquardt sehr zu Dank verpflichtet bin.

** Die γ-Globulin-Bestimmung sowie die Immunelektrophorese wurden in dankenswerter Weise von Herrn Dozent Dr. Müller, Med. Univ. Klinik Freiburg, vorgenommen.

Vergleich mit dem Kontrollserum zeigt (Abb. 2), nur um die γ-Globulin-Fraktion des Patientenserums handeln kann.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Bernhard u. Stollerman[2]. Sie stellten fest, daß 95% der AntiDPNase-Aktivität eines Mischserums in der bei 33% Ammonsulfat-Sättigung ausgefällten Serumfraktion enthalten war.

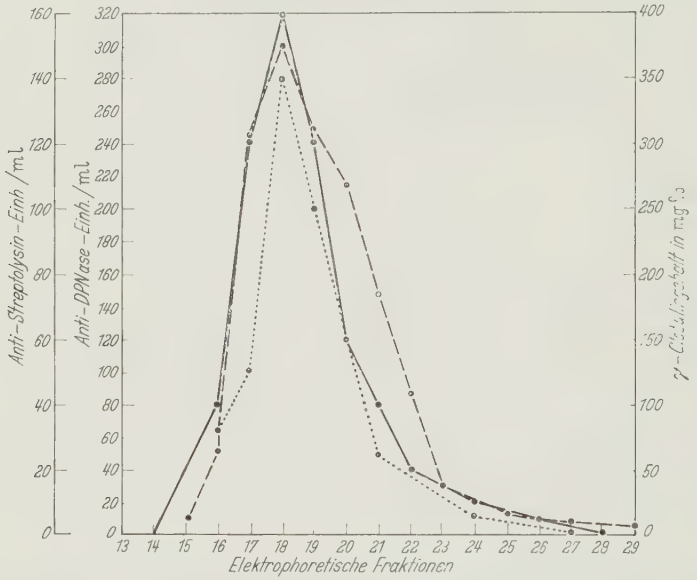


Abb. 1. Ergebnisse der Bestimmung von AntiDPNase, Antistreptolysin und γ-Globulin in elektrophoretischen Fraktionen eines Patientenserums. ——— Antistreptolysin; — — — AntiDPNase; · · · · γ-Globulin

Abb. 2. Immunelektrophoretische Analyse der elektrophoretischen Fraktion 18. *Oben* Fraktion 18; *unten* normales Menschenserum; *Graben* Antihumanglobulinserum vom Pferd (Institut Pasteur, Paris)

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde die Spezifität der Anti-Streptokokken-DPNase geprüft. Zu diesem Zweck wurden Patienten-

seren mit hohem AntiDPNase-Titer mit DPNase-Präparaten aus Neurospora crassa und Rindermilz* in folgendem Ansatz inkubiert:

Serumverdünnung 1:10	0,1 ml	—	0,1 ml	—
Neurospora-DPNase (200 E/ml)	0,2 ml	0,2 ml	—	—
Rindermilz-DPNase (1160 E/ml)	—	—	0,05 ml	0,05 ml
Phosphatpuffer (0,1 M; p_H 7,3)	0,15 ml	0,25 ml	0,3 ml	0,4 ml
20 min bei 37° C				
DPN (16 mg/ml)	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml

Nach weiterer Inkubation von 7,5 min bei 37° C Zugabe von 5,0 ml eisgekühlter Glykokollpuffer-Lösung (p_H 9,0 mit Semicarbazid-Alkohol) und Bestimmung der DPNase-Aktivität in der beschriebenen Weise.

Tabelle

		Neurospora-DPNase		Rindermilz-DPNase	
		DPNase-Aktivität in 0,5 ml	Hemmung in %	DPNase-Aktivität in 0,5 ml	Hemmung in %
Kontrolle ohne Serum		40,6	—	58,1	—
Serum 1424 (6530 AntiDPNase-E/ml)	1:10	30,3	25,4	57,9	0,6
	1:20	31,0	23,8	–	
Serum 1477 (1920 AntiDPNase-E/ml	(1:10)	32,0	21,3	55,0	5,4
Serum 1453 (2380 AntiDPNase-E/ml)	(1:10)	33,5	17,6	58,8	(+1,1)
Serum 1427 (3920 AntiDPNase-E/ml)	(1:10)	37,0	9,0	55,6	4,3
Serum 1410 (4850 AntiDPNase-E/ml)	(1:10)	31,0	23,8	57,7	0,9
Serum 1403 (<20 AntiDPNase-E/ml)	(1:10)	27,4	32,8	55,3	4,9

Neben dem Ansatz ohne Serumzusatz wurde als weitere Kontrolle ein Ansatz mit einem Serum ohne nachweisbare Antikörper gegen Streptokokken-DPNase geprüft.

Die Ergebnisse der in dieser Weise durchgeführten Versuche sind in der Tabelle dargestellt. Es zeigt sich, daß die DPNase aus Rindermilz

* Für die Überlassung der Enzympräparate aus Neurospora crassa und Rindermilz bin ich den Herren Kubowitz und Dipl.-Chem. Stathakos (Lehrstuhl für organische Chemie des Chemischen Laboratoriums der Universität Freiburg) sehr zu Dank verpflichtet.

durch die Anti-Streptokokken-DPNase nicht gehemmt wird. Die beobachteten geringen Differenzen dürften methodisch bedingt sein. Daß eine spezifische Hemmung nicht vorliegen kann, dürfte auch aus dem Vergleich mit dem „negativen" Serum hervorgehen.

Etwas anders liegen die Verhältnisse bei der Neurospora-DPNase. In der Verdünnung 1:10 verursachen alle geprüften Seren eine Hemmung der Enzymaktivität, die zwischen 9 und 33% des Kontrollwertes schwankt. Es läßt sich dabei jedoch weder eine Abhängigkeit von der Serumkonzentration (Serum 1424) noch von dem Antikörpertiter der geprüften Seren gegen die Streptokokken-DPNase nachweisen; zufällig weist das „negative" Kontrollserum sogar die stärkste Hemmung der Neurospora-DPNase auf. Gegen eine spezifische, d. h. auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhende Enzyminaktivierung sprechen auch quantitative Überlegungen: Von 0.1 ml des 1:10 verdünnten Serums 1424 werden 10.6 E Neurospora-DPNase inaktiviert gegenüber 6530 E der Streptokokken-DPNase.

Als Ergebnis dieser Versuche kann geschlossen werden, daß zwischen der Streptokokken-DPNase einerseits und den gegenüber dem gleichen Substrat wirksamen Enzymen aus Neurospora crassa und Rindermilz andererseits keine zu Kreuzreaktionen, d. h. zu „unspezifischen" Enzymhemmungen führende Antigengemeinschaft besteht.

Diskussion

Obwohl sich die Antistreptolysin-Reaktion für die Serodiagnose der Streptokokken-Infektionen als sehr wertvoll erwiesen hat, ist doch immer wieder versucht worden, die Sicherheit der diagnostischen Aussage durch den zusätzlichen Nachweis von Antikörpern gegen andere Streptokokken-Antigene zu erhöhen. Aus diesem Bestreben heraus sind verschiedene extracelluläre Enzyme der Streptokokken auf ihre Eignung als Antigene für den Antikörpernachweis geprüft worden. Als recht wertvoll in dieser Hinsicht haben sich die Hyaluronidase, die Streptokinase und die Desoxyribonuclease B erwiesen. Der Nachteil dieser Enzyme ist vorwiegend darin zu sehen, daß sie gegen chemisch nicht oder nur ungenügend (besonders in bezug auf ihre Molekülgröße) definierte Substrate gerichtet sind, so daß die Methoden zum Nachweis von Enzymaktivität und Antikörpertiter nicht befriedigend standardisierbar sind.

Gerade hier liegt der Vorteil der AntiDPNase-Reaktion: Mit Hilfe des enzymatisch-optischen Tests läßt sich durch vergleichende Messungen des DPN-Gehalts einer Lösung vor und nach Enzymzugabe die DPNase-Aktivität sehr exakt bestimmen und entsprechend auch der Anti-DPNase-Titer eines Serums. Eine dazu geeignete Methode, welche die in Untersuchungen über die Kinetik der enzymatischen DPN-Spaltung

ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen berücksichtigt, ist in einer früheren Mitteilung[19] beschrieben worden.

Es lag daher nahe, die Eignung der AntiDPNase-Reaktion für die serologische Diagnose von Streptokokken-Infektionen zu prüfen. Diese Prüfung ist an einer großen Zahl von Seren gesunder und kranker Personen vorgenommen worden, wobei die ermittelten AntiDPNase-Titer zum Antistreptolysin-Gehalt der gleichen Seren sowie zur Krankheitsdiagnose und anderen klinischen Daten in Beziehung gesetzt wurden.

Bei diesen Untersuchungen, über die gesondert berichtet werden wird, ergab sich kein Anhalt für eine unspezifische, d. h. nicht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhende DPNase-Hemmung, durch welche, wie das bei der Antistreptolysin-Reaktion bekannt ist (Hewitt u. Todd[10]; Packalén[18]; Oker-Blom u. Mitarb.[17]; Bernheimer[3]; Badin u. Cabau[1]; Scheiffarth u. Mitarb.[22]), eine Antikörperwirkung vorgetäuscht werden kann. Dementsprechend konnte bei der Untersuchung von elektrophoretischen Fraktionen eines Serums gezeigt werden, daß die Anti DPNase in der γ-Globulin-Fraktion des Serums lokalisiert ist. Neben ihrer Absorbierbarkeit durch DPNase sowie neben ihrer relativen Thermostabilität (30 min 56° C) darf das als weiterer Beweis für den Antikörper-Charakter der Anti-DPNase gewertet werden.

In einer weiteren Untersuchungsreihe konnte gezeigt werden, daß die Anti-Streptokokken-DPNase keine Hemmung der aus Neurospora crassa und Rindermilz gewonnenen DPNasen verursacht. Nach dem Ergebnis dieser Untersuchungen ist es nicht wahrscheinlich, daß die Streptokokken-DPNase Antigengemeinschaften mit DPNasen anderer Provenienz aufweist. Das ist um so weniger zu erwarten, als nach den Untersuchungen von Bernheimer u. Mitarb.[4] sowie Lazarides u. Bernheimer[11] die Streptokokken-DPNase das einzige von Bakterien produzierte Enzym ist, welches das DPN an der Nicotinsäureamid-Ribose-Bindung spaltet: bei Untersuchung von 42 anderen Bakterienarten (sowie von drei Hefearten) konnte in keinem Fall die Bildung einer DPNase nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

Untersuchungen zur Frage der Eignung der Streptokokken-DPNase als Antigen für die Serodiagnose von Streptokokken-Infektionen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die DPNase-Reaktion, d.h. der Nachweis von Antikörpern, welche die Aktivität der Streptokokken-DPNase neutralisieren, führt zu Ergebnissen, deren Reproduzierbarkeit besser ist als die der übrigen bisher geprüften Reaktionen zum Nachweis von Streptokokken-Antikörpern.

2. Die AntiDPNase ist ein Immunantikörper: sie ist (zumindest überwiegend) in der γ-Globulin-Fraktion des Serums lokalisiert. Unspezifische DPNase-Inhibitionen, durch welche, ähnlich wie gelegentlich

bei der Antistreptolysin-Reaktion, Antikörper vorgetäuscht werden, konnten bei der AntiDPNase-Reaktion bisher nicht festgestellt werden.

3. Die Aktivität von DPNase-Präparaten aus Neurospora crassa und Rindermilz wird durch Antikörper gegen die Streptokokken-DPNase nicht beeinträchtigt; danach besteht zwischen den DPNasen aus Neurospora crassa und Rindermilz einerseits und dem entsprechenden Enzym aus Streptokokken andererseits keine Antigengemeinschaft, welche zu unspezifischen Hemmungen der Enzymaktivität führen könnte. Die AntiDPNase-Reaktion unter Verwendung der Streptokokken-DPNase als Antigen dürfte somit als eine für Streptokokken-Infektionen spezifische Reaktion anzusehen sein.

Literatur

[1] Badin, J., et N. Cabau: Les fausses antistreptolysines. Path. et Biol. **7**, 1559—1564 (1959).

[2] Bernhard, G. C., and G. H. Stollerman: Serum inhibition of streptococcal diphosphopyridine nucleotidase in uncomplicated streptococcal pharyngitis and rheumatic fever. J. clin. Invest. **38**, 1942—1949 (1959).

[3] Bernheimer, A. W.: Streptolysins and their inhibitors. In: Streptococcal Infections, p. 19—38. Ed. by M. McCarty, New York: Columbia Univ. Press 1954.

[4] Bernheimer, A. W., P. D. Lazarides and A. T. Wilson: Diphosphopyridine nucleotidase as an extracellular product of streptococcal growth and its possible relationship to leukotoxicity. J. exp. Med. **106**, 27—37 (1957).

[5] Christ, P.: Über die Bedeutung von Streptokokkeninfektionen in der Pathogenese der akuten Polyarthritis und der akuten Nephritis. Erg. inn. Med. Kinderheilk. N. F. **11**, 379—464 (1959).

[6] Faber, V.: Anti-streptococcal-hyaluronidase. I. The turbidimetric method for determination of antistreptococcal hyaluronidase (ASH) in serum. Acta path. microbiol. scand. **32**, 147—156 (1953).

[7] Friou, G. J.: Further observations of an inhibitor in human serum of the hyaluronidase produced by a strain of hemolytic streptococcus. J. infect. Dis. **84**, 240—251 (1949).

[8] Friou, G. J., and H. A. Wenner: On the occurrence in human serum of an inhibitory substance to hyaluronidase produced by a strain of hemolytic streptococcus. J. infect. Dis. **80**, 185—193 (1947).

[9] Harris, T. N., and S. Harris: Turbidimetric measurements of streptococcal antihyaluronidase in the sera of patients with streptococcal infections and rheumatic fever. J. Immunol. **63**, 249—260 (1949).

[10] Hewitt, L. F., and E. W. Todd: The effect of cholesterol and of sera contaminated with bacteria on the haemolysins produced by haemolytic streptococci. J. Path. Bact. **48**, 45 (1939).

[11] Kalbak, K.: Experimentelle og kliniske Undersøgelser over O-Streptolysin og Forekomsten af O-Antistreptolysin i Serum. Kopenhagen: Ejnar Munksgaard 1942.

[12] Kaplan, M. H.: Studies on streptococcal fibrinolysis. III. A quantitative method for the estimation of serum antifibrinolysin. J. clin. Invest. **25**, 347—351 (1946).

[13] Köhler, W.: Die Serologie des Rheumatismus und der Streptokokkeninfektionen. Leipzig: Barth 1959.

[14] Lazarides, P. D., and A. W. Bernheimer: Association of production of diphosphopyridine nucleotidase with serological type of group A streptococcus J. Bact. **74**, 412—413 (1957).

[15] Legler, F.: Erfahrungen mit der Antistreptolysinreaktion. Z. Immun-Forsch. **112**, 99—121 (1955).

[16] McClean, D.: Studies on diffusing factors. 2. Methods of assay of hyaluronidase and their correlation with skin diffusing activity. Biochem. J. **37**, 169—177 (1943).

[17] Oker-Blom, N., E. Nikkila and T. Kalaja: Non-specific antistreptolysin reactions in hepatitis sera. Ann. Med. exp. Fenn. **28**, 125 (1950).

[18] Packalén, T.: Nonspecific antistreptolysin reactions and serum (or pleural exudate) cholesterol. J. Bact. **56**, 143—156 (1948).

[19] Petersen, K. F.: Untersuchungen über die Streptokokken-Diphosphopyridinnucleotidase. II. Reaktionskinetische Studien, Entwicklung von Methoden zum Enzym- und Antikörpernachweis. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **147**, 357—368 (1961).

[20] Quinn, R. W.: Studies on the mucin-clot prevention test for the determination of the anti-hyaluronidase titre of human serum. J. clin. Invest. **27**, 463—470 (1948).

[21] Scheidegger, J.: Une micro-méthode de l'immuno-électrophorése. Int. Arch. Allergy **7**, 103 (1955).

[22] Scheiffarth, F., G. Berg, F. Legler, E. Roller u. H. Schön: Untersuchungen über die Bedeutung einzelner Lipoid- und Proteinfraktionen des Serums als Streptolysininhibitoren. II. Mitteilung: Die Ergebnisse präparativ-elektrophoretischer Untersuchungen. Klin. Wschr. **39**, 949—951 (1961).

[23] Schultze, H. E., G. Schwick u. H. Vasters: Nachweis von Antistreptolysin O mit stabilem Trockenantigen. Untersuchungsergebnisse bei gesunden Personen. Ärztl. Wschr. **9**, 324—328 (1954).

Doz. Dr. K. F. Petersen,
Hygiene-Institut der Universität, 78 Freiburg i. Br., Hermann Herder-Straße 11

Autorenverzeichnis

Adldinger, H., Experimentelle Untersuchungen über das Antikörperbild des Rindes nach einer Infektion mit dem Vaccinevirus (Poxvirus officinale). 517

An die Mitarbeiter und Leser unserer Zeitschrift. 1

Badiali, L., Weitere Versuche über die Anwendung der INH-Chemoprophylaxe bei der Rindertuberkulose. 157

Benger, H., Zur Biosynthese der Dipicolinsäure. Ein Beitrag zur Biologie der Sporenbildung. 318

Berger, U., Reduktion von Nitrat und Nitrit durch Neisseria. 45

— Über das Vorkommen von Neisserien bei einigen Tieren. 445

— und H. Brunhoeber, Neisseria flava (Bergey et al., 1923): Art oder Varietät? 39

— und E. Paepcke, Untersuchungen über die asaccharolytischen Neisserien des menschlichen Nasopharynx. 269

Bockholt, L., s. Müller, F., K. Hermes und W. Hermes. 412

Brodhage, H., Harnstoff-Extrakte aus gramnegativen Bakterien in der indirekten Hämagglutinationsreaktion. I. Mitteilung: Harnstoff-Extrakte aus S. typhi, paratyphi-B, cholerae suis und Shig. sonnei. 94

— Harnstoff-Extrakte aus gramnegativen Bakterien in der indirekten Hämagglutinationsreaktion. II. Mitteilung. Die serologische Beziehung zwischen dem „C-Antigen" und dem Rauh-Antigen. 208

Brunhoeber, H., s. Berger, U. 39

Daikos, G. K., s. Malamos, B., P. Kourkoumeli-Kontomichalou and E. Pinetidou. 241

Deppe, H. D., s. Lutzmann, L. 458

Dimow, I., W. Wesselinoff und R. Rohde, Salmonellabefall von Landschildkröten (testudo graeca) in Bulgarien. I. Mitteilung. 135

Ehrengut, W., Über Persistenz des Vaccine-Virus nach der Pockenschutzimpfung. Zugleich ein Beitrag zur Frage der vaccinalen Immunität. 230

Flamm, H., und G. Wiedermann, Infektionen durch den Actinobacillus lignieresi beim Menschen. 368

Gieseler, A., s. Haas, R., R. Thomssen und G. Maass. 2

Gillissen, G., Die immunologische Antwort auf Salmonella-Extrakte. 105

Gramlich, F., s. Müller, H. E. 582

Gröschel, D., und G. Pulverer, Die in vitro-Empfindlichkeit von Enterokokken gegen die gebräuchlichen Antibiotica. 201

— s. Pulverer, G. 193

Grün, L., Versuch einer Analyse der Antigene b und h der pyogenen Staphylokokken. 345

Grund, S., und H.-G. Hilliger, Beziehung zwischen Substanzgehalt und Präcipitationstiter in Abhängigkeit von einigen Herstellungsfaktoren bei Fuller-Antigenen. 565

Haas, R., R. Thomssen, G. Maass und A. Gieseler, Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. I. Mitteilung. Untersuchungen über die Adsorption und Elution von Polioviren unter Verwendung von Aluminiumhydroxyd als Adsorbens. 2

— s. Thomssen, R., und G. Maass. 14

Hartwigk, H., Untersuchungen über das Hämolysin des Corynebacterium (C.) pyogenes und seiner atypischen Variante. 142

Heifer, U., Erfahrungen mit der Hitzeeinwirkung von 70° C bei der Herstellung von Ant-N-Testseren. 28

Henigst, W., Orientierende Untersuchungen über das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gegen Coxsackieviren in der gesunden Bevölkerung. 307

— Virologische und serologische Befunde bei gehäuft auftretenden Echovirus Typ 8-Infektionen. 557

Hennessen, W., L. Körner und R. Mauler, Experimentelle Untersuchungen über die Konkurrenz der Antigene. 61
Hermes, K., s. Müller, F., W. Hermes und L. Bockholt. 412
Hermes, W., s. Müller, F., K. Hermes und L. Bockholt. 412
Hilliger, H.-G., s. Grund, S. 565
Hüther, W., s. Kienitz, M., W. Ritzerfeld und J. Rath. 159
Jusatz, H. J., Dritter Bericht über das Vordringen der Tularämie nach Mittel- und Westeuropa über den Zeitraum von 1950—1960. 69
Kienitz, M., W. Ritzerfeld, W. Hüther und J. Rath, Tierexperimentelle Studien zum Problem der natürlichen Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen. IV. Mitteilung. Der Einfluß von Staphylokokkentoxinen auf die mit Fremdeiweiß vorbehandelte weiße Ratte. 159
Knapp, W., Untersuchungen mit Pasteurella pseudotuberculosis- und Pasteurella pestis-Phagen. 375
Knothe, H., und H. Mieth, Das Verhalten der Enterokokkenflora des Menschen nach oraler Verabreichung von Tetracyclin. 51
Körner, L., s. Hennessen, W., und R. Mauler. 61
Kopp, R., Schwärmhemmung von Proteus durch hypotone und hypertone Nährmedien. 501
Kourkoumeli-Kontomichalou, P., s. Malamos, B., G. K. Daikos and E. Pinetidou. 241
Lennartz, H., s. Pette, H., G. Maass, L. Valenciano und K. Mannweiler. 168
Lutzmann, L., und H. D. Deppe, Über den Einfluß von Cylophosphamid (Endoxan) und 2,3,5-Tris-äthylen-imino-benzochinon (Trenimon) auf die Antikörperbildung bei der Ratte. 458
Maass, G., und R. Thomssen, Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. IV. Mitteilung. Die intratypische Differenzierung von ECHO-9 Virusstämmen durch Elution von Aluminiumhydroxyd. 491
— s. Haas, R., R. Thomssen und A. Gieseler. 2
— s. Pette, H., H. Lennartz, L. Valenciano und K. Mannweiler. 168
— s. Thomssen, R. 476
— s. Thomssen, R., und R. Haas. 14
Mahnel, H., Reaktivierung zwischen Vaccine- und Variolavirus. 296
Malamos, B., G. K. Daikos, P. Kourkoumeli-Kontomichalou and E. Pinetidou, Faecal Flora in protozoal and common Colitis Changes after Therapeutic use of Intestinal Antiseptics. I. Paromomycin. 241
Mannweiler, K., s. Pette, H., H. Lennartz, G. Maass und L. Valenciano. 168
Mauler, R., s. Hennessen, W., und L. Körner. 61
Mayer, U., Katalaseaktivität und Resistenz von S. typhimurium gegenüber Spiramycin. 590
Mayr, A., Untersuchungen über die Gefahr einer Verunreinigung des Pockenimpfstoffes durch ECBO-Viren. 282
Mieth, H., s. Knothe, H. 51
Müller, F., K. Hermes, W. Hermes und L. Bockholt, Untersuchungen mit komplementbindenen G-, V- und S-Antigenen bei der experimentellen und natürlichen Herpes simplex-Infektion. 412
Müller, G. s. Rohde, R., 228
Müller, H. E., und F. Gramlich, Zur Valenz von präcipitierenden Antigen-Antikörper-Systemen. 582
Obiger, G., Die Streptokokkenflora in den bovinen Tonsillen. 405
Paepcke, E., s. Berger, U. 269
Petersen, K. F., Untersuchungen über die Streptokokken-Diphosphopyridinnucleotidase. III. Versuche zur kompetitiven Hemmung der Enzymaktivität. 539
— Untersuchungen über die Streptokokken-Diphosphopyridinnucleotidase. IV. Untersuchungen zur Frage der Eignung der Streptokokken-DPNase als Antigen für die Serodiagnose der Streptokokken-Infektionen. 596
Pette, H., H. Lennartz, G. Maass, L. Valenciano und K. Mannweiler, Die Neuropathogenität abgeschwächter Polioviren im Affenexperiment. 168
Pinetidou, E., s. Malamos, B., G. K. Daikos and P. Kourkoumeli-Kontomichalou. 241
Pulverer, G., und D. Gröschel, In vitro-Untersuchungen zur Fermentausstattung von Enterokokken. 193
— s. Gröschel, D. 201

Rath, J., s. Kienitz, M., W. Ritzerfeld und W. Hüther. 159
Reusse, U., Das Verhalten von Brucellen und verschiedenen anderen Bakterienarten in sauerstoffreichen bzw. -armen Bouillon-Kulturen. 115
— Über die dissoziationsverhindernde Wirkung von Erythrocyten in Blutkulturen. 123
— Der Einfluß von Sauerstoff auf die Selektion von S-Zellen aus dissoziierten Kulturen. 127
— Untersuchungen zur dissoziationsinduzierenden Wirkung des Alanins bei Brucellen. 131
Ritzerfeld, W., Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung von Paromomycin. 507
— s. Kienitz, M., W. Hüther und J. Rath. 159
Roemer, G. B., Über den Einfluß frischen menschlichen Serums auf die Tetracyclinwirkung in vitro. 214
Rohde, R., s. Dimow, I., und W. Wesselinoff. 135
Rohde, R., und G. Müller, S. makumira — 4,12: e, n, x:1,7, eine neue Salmonella-spezies aus einer Vogelkotprobe 228
Rott, R., s. Schäfer, W. 256
Schäfer, W., und R. Rott, Herstellung von Virusvaccinen mit Hydroxylamin. Verlauf der Inaktivierung und Wirkung des Hydroxylamins auf verschiedene biologische Eigenschaften einiger Viren. 256
Seeliger, H. P. R., und H. Werner, Quantitative und qualitative Untersuchungen über die anaeroben Lactobacillen im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. Beitrag zum Bifidus-Problem. 383
Staib, F., Cryptococcus neoformans und Guizotia abyssinica (syn. G. oleifera D. C.) (Farbreaktion für Cr. neoformans). 466
Stenzel, W., Über den Einfluß der Streptomycinresistenz auf die Virulenz von Shigellen und Coli-Shigella-Hybriden. 152
— Sh. scholtensii und Sh. manolovii — zwei zur Untergruppe D zu stellende provisorische Shigella-Typen. 433
— Untersuchungen über die Spezifität des gewebsimmunogenen Faktors schleimhautpathogener Enterobacteriacaen. 512
Stickl, H., Über die Freisetzung von bakterienfördernden Substanzen aus receptorhaltigen Materialien des Körpers durch Influenza-A-Virus. Ein Beitrag zum Virus-Bakterien-Synergismus. 354
Thomssen, R., und G. Maass, Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. III. Mitteilung. Das Verhalten der Poliovirusstämme Mahoney und LSc, 2 ab bei der Elution von Aluminiumhydroxyd als stabiles Virusmerkmal. 476
— G. Maass und R. Haas, Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. II. Mitteilung. Unterschiedliches Verhalten verschiedener Poliovirusstämme (Wildstämme und abgeschwächte Stämme) bei der Elution von Aluminiumhydroxyd. 14
— s. Haas, R., G. Maass und A. Gieseler. 2
— s. Maass, G. 491
Valenciano, L., s. Pette, H., H. Lennartz, G. Maass und K. Mannweiler. 168
Velaudapillai, T., A new Medium for enteric Bacteriology III. 553
Warnecke, B., Antibiotische Resistenzlage von Salmonella manchester und Behandlungsergebnisse entsprechender Salmonellosen und Keimträger. 546
Werner, H., s. Seeliger, H. P. R. 383
Wesselinoff, W., s. Dimow, I., und R. Rohde. 135
Wiedermann, G., s. Flamm, H. 368

ZEITSCHRIFT FÜR HYGIENE UND INFEKTIONSKRANKHEITEN

MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE UND VIROLOGIE

HERAUSGEGEBEN VON

R. HAAS
FREIBURG I. BR.

W. KIKUTH
DÜSSELDORF

P. KLEIN
MAINZ

SCHRIFTLEITUNG

W. KIKUTH
DÜSSELDORF

148. BAND

MIT 126 TEXTABBILDUNGEN

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961/62

Alle Rechte, einschließlich das der Übersetzung in fremde Sprachen und das der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung, vorbehalten. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0,30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Springer-Verlag OHG / Berlin · Göttingen · Heidelberg

Printed in Germany

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH, Wiesbaden

Inhaltsverzeichnis des 148. Bandes

1. Heft

(Abgeschlossen am 27. Oktober 1961)

Seite

An die Mitarbeiter und Leser unserer Zeitschrift 1

Haas, R., R. Thomssen, G. Maass und A. Gieseler, Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. I. Mitteilung: Untersuchungen über die Adsorption und Elution von Polioviren unter Verwendung von Aluminiumhydroxyd als Adsorbens. Mit 3 Textabbildungen 2

Thomssen, R., G. Maass und R. Haas, Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. II. Mitteilung: Unterschiedliches Verhalten verschiedener Poliovirusstämme (Wildstämme und abgeschwächte Stämme) bei der Elution von Aluminiumhydroxyd. Mit 4 Textabbildungen 14

Heifer, U., Erfahrungen mit der Hitzeeinwirkung von 70° C bei der Herstellung von Anti-N-Testseren. Mit 1 Textabbildung 28

Berger, U., und H. Brunhoeber, Neisseria flava (Bergey et al., 1923): Art oder Varietät? 39

Berger, U., Reduktion von Nitrat und Nitrit durch Neisseria 45

Knothe, H., und H. Mieth, Das Verhalten der Enterokokkenflora des Menschen nach oraler Verabreichung von Tetracyclin 51

Hennessen, W., L. Körner, und R. Mauler, Experimentelle Untersuchungen über die Konkurrenz der Antigene. Mit 6 Textabbildungen 61

Jusatz, H. J., Dritter Bericht über das Vordringen der Tularämie nach Mittel- und Westeuropa über den Zeitraum von 1950 bis 1960. Mit 2 Textabbildungen 69

Brodhage, H., Harnstoff-Extrakte aus gramnegativen Bakterien in der indirekten Hämagglutinationsreaktion. I. Mitteilung: Harnstoff-Extrakte aus S. typhi, paratyphi-B, cholerae suis und Shig. sonnei. Mit 1 Textabbildung 94

Gillissen, G., Die immunologische Antwort auf Salmonella-Extrakte. Mit 7 Textabbildungen 105

2. Heft

(Abgeschlossen am 28. November 1961)

Reusse, U., Das Verhalten von Brucellen und verschiedenen anderen Bakterienarten in sauerstoffreichen bzw. -armen Bouillon-Kulturen. Mit 3 Textabbildungen 115

Reusse, U., Über die dissoziationsverhindernde Wirkung von Erythrocyten in Blutkulturen 123

Reusse, U., Der Einfluß von Sauerstoff auf die Selektion von S-Zellen aus dissoziierten Kulturen 127

Seite

Reusse, U., Untersuchungen zur dissoziations-induzierenden Wirkung des Alanins bei Brucellen 131

Dimow, I., W. Wesselinoff und R. Rohde, Salmonellabefall von Landschildkröten (testudo graeca) in Bulgarien. I. Mitteilung 135

Hartwigk, H., Untersuchungen über das Hämolysin des Corynebacterium (C.) pyogenes und seiner atypischen Variante 142

Stenzel, W., Über den Einfluß der Streptomycinresistenz auf die Virulenz von Shigellen und Coli-Shigella-Hybriden 152

Badiali, L., Weitere Versuche über die Anwendung der INH-Chemoprophylaxe bei der Rindertuberkulose 157

Kienitz, M., W. Ritzerfeld, W. Hüther und J. Rath, Tierexperimentelle Studien zum Problem der natürlichen Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen. IV. Mitteilung: Der Einfluß von Staphylokokkentoxinen auf die mit Fremdeiweiß vorbehandelte weiße Ratte 159

Pette, H., H. Lennartz, G. Maass, L. Valenciano und K. Mannweiler, Die Neuropathogenität abgeschwächter Polioviren im Affenexperiment. Mit 10 Textabbildungen 168

3. Heft

(Abgeschlossen am 15. Februar 1962)

Pulverer, G., und D. Gröschel, In vitro-Untersuchungen zur Fermentausstattung von Enterokokken 193

Gröschel, D., und G. Pulverer, Die in vitro-Empfindlichkeit von Enterokokken gegen die gebräuchlichen Antibiotica 201

Brodhage, H., Harnstoff-Extrakte aus gramnegativen Bakterien in der indirekten Hämagglutinationsreaktion. II. Mitteilung. Die serologische Beziehung zwischen dem „C-Antigen" und dem Rauh-Antigen 208

Roemer, G. B., Über den Einfluß frischen menschlichen Serums auf die Tetracyclinwirkung in vitro. Mit 5 Textabbildungen 214

Rohde, R., und G. Müller, S. makumira = 4,12:e,n,x:1,7, eine neue Salmonella-species aus einer Vogelkotprobe 228

Ehrengut, W., Über Persistenz des Vaccine-Virus nach der Pockenschutzimpfung. Zugleich ein Beitrag zur Frage der vaccinalen Immunität. Mit 1 Textabbildung 230

Malamos, B., G. K. Daikos, P. Kourkoumeli-Kontomichalou and E. Pinetidou, Faecal Flora in protozoal and common Colitis. Changes after Therapeutic use of Intestinal Antiseptics. I. Paromomycin 241

Schäfer, W., und R. Rott, Herstellung von Virusvaccinen mit Hydroxylamin. Verlauf der Inaktivierung und Wirkung des Hydroxylamins auf verschiedene biologische Eigenschaften einiger Viren. Mit 8 Textabbildungen . . . 256

4. Heft

(Abgeschlossen am 3. Mai 1962)

Berger, U., und E. Paepcke, Untersuchungen über die asaccharolytischen Neisserien des menschlichen Nasopharynx. Mit 8 Textabbildungen 269

Mayr, A., Untersuchungen über die Gefahr einer Verunreinigung des Pockenimpfstoffes durch ECBO-Viren 282

Mahnel, H., Reaktivierung zwischen Vaccine- und Variolavirus 296

Henigst, W., Orientierende Untersuchungen über das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gegen Coxsackieviren in der gesunden Bevölkerung. Mit 3 Textabbildungen 307

Seite

Benger, H., Zur Biosynthese der Dipicolinsäure. Ein Beitrag zur Biologie der Sporenbildung. Mit 18 Textabbildungen 318

Grün, L., Versuch einer Analyse der Antigene b und h der pyogenen Staphylokokken 345

Stickl, H., Über die Freisetzung von bakterienfördernden Substanzen aus receptorhaltigen Materialien des Körpers durch Influenza-A-Virus. Ein Beitrag zum Virus-Bakterien-Synergismus. Mit 8 Textabbildungen 354

Flamm, H., und G. Wiedermann, Infektionen durch den Actinobacillus lignieresi beim Menschen 368

Knapp, W., Untersuchungen mit Pasteurella pseudotuberculosis- und Pasteurella pestis-Phagen 375

5. Heft

(Abgeschlossen am 3. Juli 1962)

Seeliger, H. P. R., und H. Werner, Quantitative und qualitative Untersuchungen über die anaeroben Lactobacillen im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. Beitrag zum Bifidus-Problem 383

Obiger, G., Die Streptokokkenflora in den bovinen Tonsillen 405

Müller, F., K. Hermes, W. Hermes und L. Bockholt, Untersuchungen mit komplementbindenden G-, V- und S-Antigenen bei der experimentellen und natürlichen Herpes simplex-Infektion. Mit 4 Textabbildungen 412

Stenzel, W., Sh. scholtensii und Sh. manolovii — zwei zur Untergruppe D zu stellende provisorische Shigella-Typen 433

Berger, U., Über das Vorkommen von Neisserien bei einigen Tieren. Mit 3 Textabbildungen 445

Lutzmann, L., und H. D. Deppe, Über den Einfluß von Cylophosphamid (Endoxan) und 2,3,5-Tris-äthylen-imino-benzochinon (Trenimon) auf die Antikörperbildung bei der Ratte. Mit 1 Textabbildung 458

Staib, F., Cryptococcus neoformans und Guizotia abyssinica (syn. G. oleifera D.C.). (Farbreaktion für Cr. neoformans). Mit 4 Textabbildungen, davon 3 farbigen 466

Thomssen, R., und G. Maass, Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. III. Mitteilung, Das Verhalten der Poliovirusstämme Mahoney und LSc, 2 ab bei der Elution von Aluminiumhydroxyd als stabiles Virusmerkmal. Mit 4 Textabbildungen . . 476

Maass, G., und R. Thomssen, Über die Verwendung von Aluminiumhydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. IV. Mitteilung, Die intratypische Differenzierung von ECHO-9 Virusstämmen durch Elution von Aluminiumhydroxyd. Mit 5 Textabbildungen 491

6. (Schluß-)Heft

(Abgeschlossen am 12. Oktober 1962)

Kopp, R., Schwärmehemmung von Proteus durch hypotone und hypertone Nährmedien 501

Ritzerfeld, W., Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung von Paromomycin. Mit 4 Textabbildungen 507

Stenzel, W., Untersuchungen über die Spezifität des gewebsimmunogenen Faktors schleimhautpathogener Enterobacteriaceen 512

Seite

Adldinger, H., Experimentelle Untersuchungen über das Antikörperbild des Rindes nach einer Infektion mit dem Vaccinevirus (Poxvirus officinale). Mit 3 Textabbildungen 517

Petersen, K. F., Untersuchungen über die Streptokokken-Diphosphopyridinnucleotidase. III. Versuche zur kompetitiven Hemmung der Enzymaktivität. Mit 4 Textabbildungen 539

Warnecke, B., Antibiotische Resistenzlage von Salmonella manchester und Behandlungsergebnisse entsprechender Salmonellosen und Keimträger . . 546

Velaudapillai, T., A new Medium for enteric Bacteriology. III. 553

Henigst, W., Virologische und serologische Befunde bei gehäuft auftretenden Echovirus Typ 8-Infektionen 557

Grund, S., und H.-G. Hilliger, Beziehung zwischen Substanzgehalt und Präcipitationstiter in Abhängigkeit von einigen Herstellungsfaktoren bei Fuller-Antigenen. Mit 4 Textabbildungen 565

Müller, H. E., und F. Gramlich, Zur Valenz von präcipitierenden Antigen-Antikörper-Systemen 582

Mayer, U., Katalaseaktivität und Resistenz von S. typhimurium gegenüber Spiramycin 590

Petersen, K. F., Untersuchungen über die Streptokokken-Diphosphopyridinnucleotidase. IV. Untersuchungen zur Frage der Eignung der Streptokokken-DPNase als Antigen für die Serodiagnose der Streptokokken-Infektionen. Mit 2 Textabbildungen 596

Autorenverzeichnis 604

4800 018 4794 059

COUNTWAY LIBRARY
HC 66XU